

**DOTTORATO DI RICERCA**  
**ENTOMOLOGIA AGRARIA**

**Ciclo XXI°**

**Settore scientifico disciplinare: AGR 11/ENTOMOLOGIA GENERALE E APPLICATA**

**IMPIEGO DI CICLOPOIDI (*CRUSTACEA, COPEPODA*) COME  
AGENTI DI LOTTA BIOLOGICA CONTRO LE ZANZARE  
(*DIPTERA, CULICIDAE*)**

**Presentata da: RODOLFO VERONESI**

**Coordinatore Dottorato**  
**Prof. Piero Baronio**

---

**Relatore**  
**Prof. Stefano Maini**

---

**Esame finale anno 2009**

## INDICE

<b>INTRODUZIONE .....</b>	<b>3</b>
PREDATORI NATURALI NELLA LOTTA BIOLOGICA CONTRO LE ZANZARE .....	3
STORIA DELL'UTILIZZO DEI COPEPODI CICLOPOIDI .....	4
L'AZIONE DI CONTRASTO ALLA DENGUE IN VIETNAM E IL RUOLO DEI COPEPODI CICLOPOIDI .....	7
BIOLOGIA DEI COPEPODI CICLOPOIDI .....	9
POTENZIALITÀ DEI CICLOPOIDI NEI PROGRAMMI DI LOTTA ALLE ZANZARE IN ITALIA .....	10
BIBLIOGRAFIA CITATA .....	11
<b>MATERIALI E METODI .....</b>	<b>15</b>
INDAGINE FAUNISTICA .....	15
PROVE PRELIMINARI DI PREDAZIONE IN LABORATORIO .....	15
TECNICA DI ALLEVAMENTO .....	17
1 <sup>a</sup> prova di allevamento .....	18
2 <sup>a</sup> prova di allevamento .....	18
3 <sup>a</sup> prova di allevamento .....	18
PROVE DI EFFICACIA DI MACROCYCLOPS ALBIDUS IN CONDIZIONI DI SEMICAMPO E DI CAMPO .....	19
Prova di efficacia in semicampo in bidoni da 220 l di capacità .....	19
Prova di efficacia in campo in serbatoi per l'acqua irrigua degli orti .....	20
Prove di efficacia in campo in tombini stradali .....	21
BIBLIOGRAFIA CITATA .....	22
<b>RISULTATI .....</b>	<b>24</b>
INDAGINE FAUNISTICA .....	24
PROVE PRELIMINARI DI PREDAZIONE IN LABORATORIO .....	26
TECNICA DI ALLEVAMENTO .....	39
1 <sup>a</sup> prova di allevamento .....	39
2 <sup>a</sup> prova di allevamento .....	39
3 <sup>a</sup> prova di allevamento .....	41
PROVE DI EFFICACIA DI MACROCYCLOPS ALBIDUS IN CONDIZIONI DI SEMICAMPO E DI CAMPO .....	42
Prova di efficacia in semicampo in bidoni da 220 l di capacità (risultati 2007) .....	42
Prova di efficacia in semicampo in bidoni da 220 l di capacità (risultati 2008) .....	48
Prova di efficacia in campo in serbatoi per l'acqua irrigua degli orti .....	51
Prove di efficacia in campo in tombini stradali .....	53
1 <sup>a</sup> prova 2007 .....	53
2 <sup>a</sup> prova 2008 .....	55
Bibliografia citata .....	62
<b>CONSIDERAZIONI FINALI .....</b>	<b>63</b>
Bibliografia citata .....	69
<b>RINGRAZIAMENTI .....</b>	<b>72</b>

## INTRODUZIONE

### PREDATORI NATURALI NELLA LOTTA BIOLOGICA CONTRO LE ZANZARE

Lo stato delle conoscenze sui nemici naturali degli stadi preimmaginali dei culicidi, frutto di osservazioni a tutte le latitudini, fornisce un nutrito elenco di invertebrati e vertebrati (principalmente specie ittiche) predatori, obbligati e facoltativi, coinvolti nelle dinamiche biocenotiche negli ambienti acquatici naturali.

Gli Insetti è il taxon che annovera più specie predatrici nei ditteri nematoceri e brachiceri (Culicidae, Chaoboridae, Chironomidae, Dolichopodidae, Empidae, Tipulidae, Sarcophagidae, *Culicoides*), nei coleotteri (Dytiscidae, Hydrophilidae), negli Emitteri acquatici e semi-acquatici (Belostomatidae, Notonectidae, Hebridae, Mesoveliidae, Naucoridae, Nepidae, Ochteridae, Gerridae, Pleiade, Corixidae, Vellidae, Saludidae, Hydrometridae) e negli Odonati zigotteri e anisotteri. Non mancano osservazioni anche a carico di aracnidi, anellidi irudinei e turbellari. In qualche caso lo studio si è spinto a prove di efficacia in laboratorio oppure in campo a piccola scala, come per *Toxorhynchites* spp. (Diptera, Culicidae) (Legner, 1995), *Notonecta* spp. (Hemiptera, Notonectidae), per *Micronecta quadristrigata* (Hemiptera, Corixidae) (Nam et al. 2000) e per alcune specie di Odonati (Sebastian et al. 1990).

Si tratta di predatori che giocano un importante ruolo nelle catene trofiche degli ambienti acquatici dove le azioni di gestione ecologica possono esaltare la loro azione massimizzandone l'efficacia (Collins & Washino, 1985; Service, 1993; Legner, 1996; Kumar & Hwang, 2006; Mogi, 2007).

Nelle raccolte d'acqua artificiali delle aree residenziali i predatori sono normalmente assenti o rarefatti e gli ostacoli principali al pratico sfruttamento come agenti di biocontrollo dei culicidi attraverso lanci inoculativi sono le difficoltà di allevamento massale, dovuto in qualche caso anche alla necessità di fornire organismi vivi come cibo, di stoccaggio, per la tendenza al cannibalismo, di distribuzione, nonché

per la dimostrata scarsa efficacia in presenza di prede alternative.

Tuttavia, a parte poche specie ittiche, prime fra tutte il pecilide *Gambusia* spp. (Walton, 2007), finora soltanto i copepodi ciclopoidi (Crustacea) hanno trovato concrete possibilità applicative specialmente nelle raccolte d'acqua in manufatti artificiali (Rivière & Thirel, 1981; Marten, 1990; Marten et al., 1994; Marten et al., 2000; Brown et al., 1991; Russell et al., 1996; Calliari et al., 2003; Rey et al., 2004; Dieng et al., 2002a; Soumare et al., 2004; Gionar et al., 2006; Marten & Reid, 2007). La predazione avviene a carico soprattutto delle larve di 1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> età e se queste abbondano,



**Foto 1** Ciclopide nell'atto di consumare una larva di *Aedes albopictus* (foto R. Veronesi)

i copepodi consumano soltanto una parte del corpo portando a morte anche 30-40 larve al giorno.

## STORIA DELL'UTILIZZO DEI COPEPODI CICLOPOIDI

Le prime osservazioni sui ciclopoidei come predatori di larve di culicidi risalgono all'inizio del secolo scorso (Daniels 1901, Lewis 1932, Hurlbut 1938). Tuttavia è merito di Riviére e Thirel (1981) proporre a Tahiti *Mesocyclops leuckarti pilosa* come agente di lotta contro *Aedes aegypti* L. e di *Ae. polynesiensis* Marks. Nello stesso periodo *Mesocyclops aspericornis* è testato nelle Hawaii contro *Ae. albopictus* (Skuse) in contenitori artificiali (Marten, 1984) e in Colombia contro *Ae. aegypti* in serbatoi per lo stoccaggio dell'acqua (Suarez et al., 1984).

Marten e Reid (2007) in una recente review sull'argomento, riepilogano le prove di laboratorio e di campo finora condotte in tutto il mondo.

Le prove di laboratorio hanno coinvolto complessivamente 48 specie di ciclopoidei appartenenti a 15 generi (Tab.1) e sono state condotte applicando la tipica procedura per la quale a uno o più copepodi è sottoposto un prestabilito numero di giovani larve in un piccolo volume di acqua, e a 24 ore vengono contate quelle sopravvissute. La caratteristica dei ciclopoidei è che non tutte le larve attaccate vengono completamente mangiate e ciò porta alla morte di un numero superiore al fabbisogno giornaliero.

Si tratta di specie di ciclopoidei cosmopolite, o legate ad areali tropicali, testate nei confronti di varie specie di zanzare in tutti i continenti: *Anopheles quadrimaculatus* Say, *Culex quinquefasciatus* Say, *Cx. restuans* Theobald, *Cx. salinarius* Coquillett, *Ae. aegypti*, *Ae. canadensis*, *Ae. stimulans* (Walker), *Ae. albopictus* e *Ae. sollicitans* (Walker) in Nord America; *An. farauti* Laveran, *Cx. quinquefasciatus*, *Ae. albopictus*, *Ae. aegypti*, *Cx. pipiens* e *An. albimanus* Wiedemann in centro e sud America; *An. superpictus* Grassi, *An. aconitus* Dönitz, *An. stephensi* Liston s.l., *Ae. aegypti*, *Culiseta longiareolata* (Macquart), *Cx. pipiens*, *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. tritaeniorhynchus* Giles e *Ae. albopictus* in Asia e Medio Oriente; *An. farauti* Laveran, *Cx. quinquefasciatus* e *Ae. aegypti* in Australia; *Toxorhynchites brevipalpis* Theobald, *Tx. amboinensis* (Doleschall), *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *Ae. polynesiensis* e *Cx. quinquefasciatus* in Oceania; *Anopheles* spp. in Africa; *An. claviger* Meigen in Europa

Le prove di predazione di laboratorio sono fondamentali in quanto permettono di valutare le specie più efficienti in termini di larve predate/giorno ponendo le basi per i successivi studi in semicampo e campo. Marten et al. (1994a) suggerisce il limite soglia di 30 larve attaccate al giorno per promuovere una specie candidata all'applicazione in campo. In questo senso un fattore determinante le prestazioni predatorie è la dimensione corporea. I ciclopoidei con lunghezza del corpo inferiore a 1 mm come ad es. *Microcyclops*, *Tropocyclops*, *Paracyclops* e alcune specie di *Thermocyclops* sono del tutto incapaci di attaccare le larve neosgusciate; le specie di poco più di 1 mm come quelle dei generi *Eucyclops*, *Ectocyclops*, molti *Thermocyclops*, e qualche specie di *Mesocyclops* sono occasionali predatori. *Diacyclops* e *Acanthocyclops* sono in grado di uccidere 10-30 larve/giorno mentre le specie di lunghezza > 1,4 mm dei generi *Macrocyclops*, *Megacyclops* e *Mesocyclops* possono portare a morte anche 40 larve/giorno o più (Tab.1).

A parità di dimensioni corporee tuttavia alcune specie sono più efficienti per le dimensioni delle mandibole come nel caso di *Mesocyclops longisetus* (Thiébaud) e di *M. aspericornis* (Daday). *Homocyclops ater* (Herrick) invece anche se di dimensioni ragguardevoli (1,8-4 mm) è risultato del tutto inefficiente (Marten, 1989).

In campo le applicazioni sperimentali dei ciclopoidi hanno interessato un'ampia gamma di focolai larvali in prove condotte in zone di tutto il mondo ad eccezione dell'Europa e dell'Africa.

In tutti i casi le prove avevano l'obiettivo di valutare la colonizzazione dei copepodi inoculati e l'impatto sulle specie di zanzare selvatiche ovideponenti in quegli ambienti.

Le prove in piccola scala hanno interessato perlopiù raccolte d'acqua di volume vario, tipici focolai adatti allo sviluppo di *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *Culex* spp., come serbatoi, cisterne, bidoni, giare di ceramica, vasi, secchi, pneumatici, perfino piante bromeliacee.

Coerentemente con i risultati delle prove di laboratorio le specie più efficienti sono risultate *Mesocyclops longisetus*, *M. aspericornis*, *M. woutersi* e *Macrocyclus albidus* che hanno portato ad una riduzione del 99-100% di larve di *Aedes* spp. (Kumar & Hwang, 2006; Marten & Reid, 2007).

Tali livelli di efficienza sono stati ottenuti in serbatoi di grande volume dove è possibile garantire le due principali condizioni alla base del successo del metodo: la durata della colonizzazione e la densità della popolazione dei copepodi. Aspetti legati a caratteristiche biologiche della specie (esigenze termiche, tassi riproduttivi, tendenza al cannibalismo, possibilità di sfruttare cibo alternativo, resistenza al disseccamento, mantenimento di sufficienti dimensioni corporee nella discendenza al diminuire delle risorse alimentari) e alla risposta alle interferenze esterne come ad esempio le modalità in cui vengono gestiti i prelievi di acqua o le pulizie periodiche dei contenitori.

Le prove di campo su larga scala forniscono meglio un quadro sulle possibilità applicative.

*M. aspericornis* è stato introdotto a Tahiti nelle cavità create dai granchi e sfruttate da *Ae. polynesiensis* e da *Ae. aegypti*. Nonostante una riduzione del 91-99% dove il ciclopode si è mantenuto, l'impatto sui livelli di infestazione è risultato trascurabile (Rivière et al. 1987a, 1987b).

Migliori i risultati ottenuti presso New Orleans con *M. albidus* inoculato in cumuli di pneumatici usati, dove *Ae. albopictus* ha subito un tracollo a 5 mesi dall'introduzione e non è riapparsa nei 3 anni di osservazione successivi (Marten, 1990; Weiss, 1990; Marten et al., 1994a).

Nella Polinesia francese *Mesocyclops aspericornis* è stato introdotto nei bidoni da 200 l in un villaggio, portando a una drastica soppressione delle larve di *Ae. aegypti*, ma nonostante ciò l'impatto sulle infestazioni del culicide è risultato insoddisfacente (Lardeux, 1992).

Un tentativo di far partecipare la popolazione locale al programma di controllo di *Ae. aegypti* con i copepodi risale al 1992 in Honduras dove, in un quartiere di una piccola cittadina, *M. longisetus* è stato introdotto in tutti i serbatoi domestici per lo stoccaggio dell'acqua e nei vasi portafiori. L'impossibilità di garantire un sufficiente livello di partecipazione delle casalinghe ha impedito di estendere l'esperienza, che comunque è risultata soddisfacente in termini di soppressione delle infestazioni larvali in certe tipologie di serbatoi rispetto ad altre (Marten et al., 1994a, 1994b).

**Tab.1** Specie di copepodi ciclopoidi testati in laboratorio e in campo suddivise sulla base delle prestazioni predatorie nei confronti delle larve giovani di culicidi (da Marten & Reid 2007, modificata).  
\*considerate poco efficienti anche se di dimensione >1,4 mm

Specie efficienti (dimensione ♀ >1,4 mm)	Specie non predatrici (dimensione ♀ <1 mm)
<i>Megacyclops latipes</i> (Lowndes) <i>Macrocyclus albidus</i> (Jurine) <i>Macrocyclus fuscus</i> (Jurine) <i>Macrocyclus distinctus</i> (Richard) <i>Megacyclops viridis</i> (Jurine) <i>Mesocyclops annulatus</i> (Wierzejski) <i>Acanthocyclops vernalis</i> (Fischer) <i>Mesocyclops longisetus</i> (Thi6baud) <i>Mesocyclops longisetus curvatus</i> Dussart <i>Mesocyclops pehpeiensis</i> Hu <i>Mesocyclops aspericornis</i> (Daday) <i>Mesocyclops affinis</i> Van de Velde <i>Mesocyclops edax</i> (S. A. Forbes) <i>Mesocyclops ogunnus</i> Onabamiro <i>Mesocyclops woutersi</i> Van de Velde <i>Mesocyclops venezolanus</i> Dussart <i>Mesocyclops acanthorarnus</i> Holyfiska and Brown <i>Diacyclops navus</i> (Herrick) <i>Mesocyclops darwini</i> Dussart & Fernando <i>Mesocyclops thermocyclopoides</i> Harada <i>Mesocyclops australiensis</i> (G. O. Sars)	<i>Apocylops panamensis</i> (Marsh) <i>Ectocyclops rubescens</i> Brady <i>Eucyclops bondi</i> Kiefer <i>Mesocyclops notius</i> Kiefer <i>Mesocyclops pescei</i> Petkovski <i>Metacyclops cushae</i> Reid <i>Microcyclops alius</i> (Kiefer) <i>Microcyclops anceps</i> (Richard) <i>Microcyclops varicans</i> (G. O. Sars) <i>Paracyclops chiltoni</i> (Thomson) <i>Paracyclops poppei</i> (Rehberg) <i>Therrnocyclops decipiens</i> (Kiefer) <i>Therrnocyclops inversus</i> Kiefer <i>Tropocyclops prasinus</i> (Fischer)
	<b>Specie poco efficienti (dimensione ♀ 1-1,4 mm)</b>
	<i>Microcyclops anceps</i> (Richard) <i>Thermocyclops tenuis</i> (Marsh) <i>Mesocyclops reidae</i> Petkovski <i>Metacyclops mendocinus</i> (Wierzejski) <i>Orthocyclops modestus</i> (Herrick) <i>Diacyclops thomasi</i> (S.A. Forbes) <i>Eucyclops agilis</i> (Koch) <i>Eucyclops serrulatus</i> (Fischer) <i>Diacyclops hispidus</i> Reid <i>Acanthocyclops smithae</i> Reid & Su/trez-Morales <i>Ectocyclops rubescens</i> Brady <i>Eucyclops ensifer</i> Kiefer <i>Eucyclops neumanni</i> (Pesta) <i>Eucyclops elegans</i> (Herrick)
	<hr/> <i>Acanthocyclops robustus</i> (G. O. Sars)* <i>Metacyclops grandis</i> (Kiefer)* <i>Homocyclops ater</i> (Herrick)*

Nelle raccolte d'acqua aperte rappresentate da pozze temporanee, aree umide, risaie e fossi di scolo stradali, i dati riguardanti l'impatto dei ciclopoidi sulle popolazioni di zanzare sono riferite a indagini frutto di osservazioni più che a prove condotte con lanci inoculativi o inondativi delle specie ritenute più interessanti (Jennings et al., 1995; Nam et al., 1998; Marten et al., 1989; Marten et al., 1994). Non mancano tuttavia tentativi di far colonizzare aree umide nelle quali per il periodico regime naturale di asciutta e sommersione, non si crea una colonizzazione stabile delle specie di ciclopoidi più efficienti. E' questa l'esperienza condotta da Marten et al. (1994a), presso New Orleans, il quale dopo l'introduzione di 1000 *M. albidus* e *M. longisetus* in vari punti di un'area umida di 10 ha di recente sommersione, hanno osservato una drastica riduzione delle larve di *Ae. sollicitans* e di *Anopheles crucians* Wiedemann ed un aumento delle densità dei ciclopoidi su tutta l'area, per i 4 mesi successivi prima del prosciugamento. Alla successiva sommersione *M. albidus* e *M. longisetus* non sono però riapparsi.



In una risaia della Louisiana dopo l'introduzione di *Macrocyclus albidus*, *Mesocyclops pehpeiensis*, *Mesocyclops edax* e *Mesocyclops longisetus* si è osservato un aumento della densità di tutte e 4 le specie di copepodi e un crollo, dopo due mesi dalla loro introduzione fino alla fine del ciclo colturale, di *An. quadrimaculatus* rispetto a una risaia testimone.

L'utilizzo su ampia scala di ciclopoidi trova nell'esperienza condotta in Vietnam (1993-2003) un caso studio estremamente interessante su cui vale la pena soffermarsi.

## **L'AZIONE DI CONTRASTO ALLA DENGUE IN VIETNAM E IL RUOLO DEI COPEPDI CICLOPIDI**

Prendendo spunto dall'importanza che assume nella fase attuale della civiltà umana lo sviluppo nella direzione ecologicamente sostenibile, l'utilizzo dei copepodi ciclopoidi all'interno di un programma di contrasto della diffusione della febbre Dengue e della Dengue emorragica in Vietnam, provocata da un flavivirus trasmesso da *Aedes aegypti*, offre un caso studio in cui la conoscenza dei meccanismi di interazione ecologica assieme ad incisive azioni di educazione e sensibilizzazione a livello locale possono permettere risposte sostenibili e un concreto contributo al successo del programma senza il ricorso a insetticidi (Nam et al., 1998; Marten, 2001; Kay et al., 2002). Ciò che qui viene descritto è un caso unico in cui è stato possibile arrivare perfino ad eradicare *Ae. aegypti* da molti villaggi del nord e del centro del Vietnam attraverso l'utilizzo dei copepodi integrato ad una intensa campagna di raccolta differenziata, coinvolgendo una popolazione di circa 400.000 abitanti in 46 Comuni (Kay & Nam, 2005).

La Dengue è una tipica malattia emergente che dimostra sia il fallimento completo dei metodi di contrasto delle epidemie da arbovirus finora applicati, che l'impatto negativo della globalizzazione sulle comunità dei paesi poveri (Saker et al. 2004; CDC, 2008). Come per la Malaria e la Febbre Gialla, a contribuire allo sviluppo di estese epidemie sono il deterioramento delle infrastrutture sanitarie pubbliche, l'espansione dei viaggi e del commercio internazionali e il rapido e diffuso incremento del fenomeno dell'inurbamento senza la predisposizione di servizi minimi di base.

Il progetto prende avvio nel 1993 nel villaggio di Phamboi situato a Est di Hanoi, promosso e coordinato dal Vietnam National Institute of Hygiene and Epidemiology che nel 1996 decreta l'eradicazione di *Ae. aegypti* dal villaggio.

In questa esperienza pilota è stato utilizzato un mix di varie specie di ciclopoidi autoctone con prevalenza di *Mesocyclops woutersi* Van de Velde, *M. thermocyclopoides* Harada e *M. ruttneri* Kiefer, spesso associate con altre specie non identificate del genere *Thermocyclops*, *Eucyclops* e *Microcyclops*. I copepodi sono stati utilizzati nell'ambito di una strategia integrata di lotta al vettore. Le linee di azione del progetto si basavano sul coinvolgimento ad ogni livello della popolazione che, interessata da una capillare campagna di informazione e formazione, era sensibilizzata sulla necessità di eliminare ogni possibile contenitore, potenziale focolaio di sviluppo larvale per *Ae. aegypti*. La popolazione era chiamata a partecipare ad un programma di raccolta differenziata dei rifiuti (dalla quale era possibile un tornaconto economico) e a garantire la sopravvivenza dei copepodi introdotti sistematicamente da uno staff di operatori, in ogni serbatoio di cemento (1000-3000 l), anfore e giare in ceramica e terracotta (20-200 l), utilizzate per stoccare acqua per l'uso domestico.

Dall'introduzione dei copepodi è stato condotto un monitoraggio continuo nei sei anni successivi finalizzato a verificare la presenza di copepodi, di larve e di adulti di *Ae. aegypti* in un campione

rappresentativo di abitazioni di Phamboi a confronto con un villaggio vicino non interessato a tale programma di lotta.

Nel villaggio trattato i serbatoi con ciclopoidi sono variati dall'87% al 95% durante tutto il periodo di monitoraggio. A 20 mesi dall'inizio del programma nessuna larva e adulto di *Ae.aegypti* sono stati campionati nel villaggio trattato, mentre in tutti i villaggi del distretto le infestazioni della zanzara si sono mantenute ad alti livelli.

L'esperienza di Phamboi è l'unico caso riportato in letteratura di eradicazione da un villaggio di *Ae.aegypti* negli ultimi 35 anni senza l'utilizzo di insetticidi.

I motivi del successo sono evidentemente da ricercare nelle caratteristiche dei focolai larvali e nell'efficienza di ogni aspetto del progetto. In primo luogo la tipologia dei serbatoi di acqua in cui sono stati inoculati i copepodi non richiede un particolare sforzo e attenzione da parte dei cittadini per garantire la colonizzazione e la presenza stabile dei copepodi. I serbatoi di grande volume erano svuotati raramente e in occasione della pulizia periodica delle giare le massaie sono state istruite a mantenere un poco di acqua con i copepodi da utilizzare come inoculo nel successivo riempimento o di rifornirsi presso pozzi dislocati all'interno del villaggio che fungevano da serbatoio permanente di mantenimento dei ciclopoidi.

Nel villaggio inoltre dopo la sistematica campagna di raccolta differenziata di ogni materiale, manufatto e contenitore inutilizzati da destinare al riciclaggio, i possibili focolai larvali sono stati praticamente azzerati. Fondamentale è stata infine la rapida e continua mobilitazione della comunità (a cui ha probabilmente contribuito anche l'efficienza del sistema politico socialista) spinta a partecipare al programma motivata dall'impatto delle recenti epidemie di Dengue emorragica.

Il successo ottenuto a Phanboi convinse il governo a finanziare e a garantire l'assistenza per la distribuzione dei *Mesocyclops* a molte altre comunità vietnamite. Il National Institute of Epidemiology and Hygiene riuscì a mettere a punto un economico sistema di allevamento in grado di fornire 200.000 copepodi al mese per la distribuzione su larga scala. Le specie allevate erano *Mesocyclops woutersi*, *Mesocyclops ruttneri*, *Mesocyclops thermocyclopoides* e *Mesocyclops aspericornis*.

Il programma ampliato si basò su circa 800 operatori sanitari e collaboratori e i copepodi furono distribuiti a 30.000 abitazioni al nord e al centro del Vietnam, impostando le azioni come nel modello di Phamboi. Si continuò a puntare sulla partecipazione ad ogni livello della comunità secondo un protocollo di addestramento e di applicazione delle conoscenze perfettamente organizzato. Lo staff centrale si occupava dell'addestramento degli operatori sanitari locali i quali con l'ausilio di videotapes trasmettevano le conoscenze acquisite agli insegnanti delle scuole che a loro volta organizzavano con gli studenti i gruppi per la raccolta differenziata del materiale di scarto capace di mantenere l'acqua della pioggia. Vennero arruolati volontari istruiti per l'introduzione porta a porta di 50 copepodi per serbatoio d'acqua. Ogni volontario a cui era riconosciuto un rimborso mensile, era responsabile di 50-100 abitazioni e doveva svolgere periodiche verifiche e contribuire all'espansione degli inoculi di copepodi prelevandoli dai serbatoi nei quali si constatavano alte densità.

Nel maggior numero di comunità *Ae. aegypti* è stata azzerata a 12-18 mesi dopo l'introduzione di *Mesocyclops* e con essa i casi di Dengue. L'applicazione su vasta scala territoriale del modello di Phamboi è stata la chiave che ha permesso nel lungo periodo il controllo della Dengue. A mantenere alta l'attenzione è la continua campagna di sensibilizzazione anche televisiva e l'applicazione di specifici programmi di educazione scolastica in cui *Mesocyclops* ha un ruolo chiave.



## BIOLOGIA DEI COPEPODI CICLOPOIDI

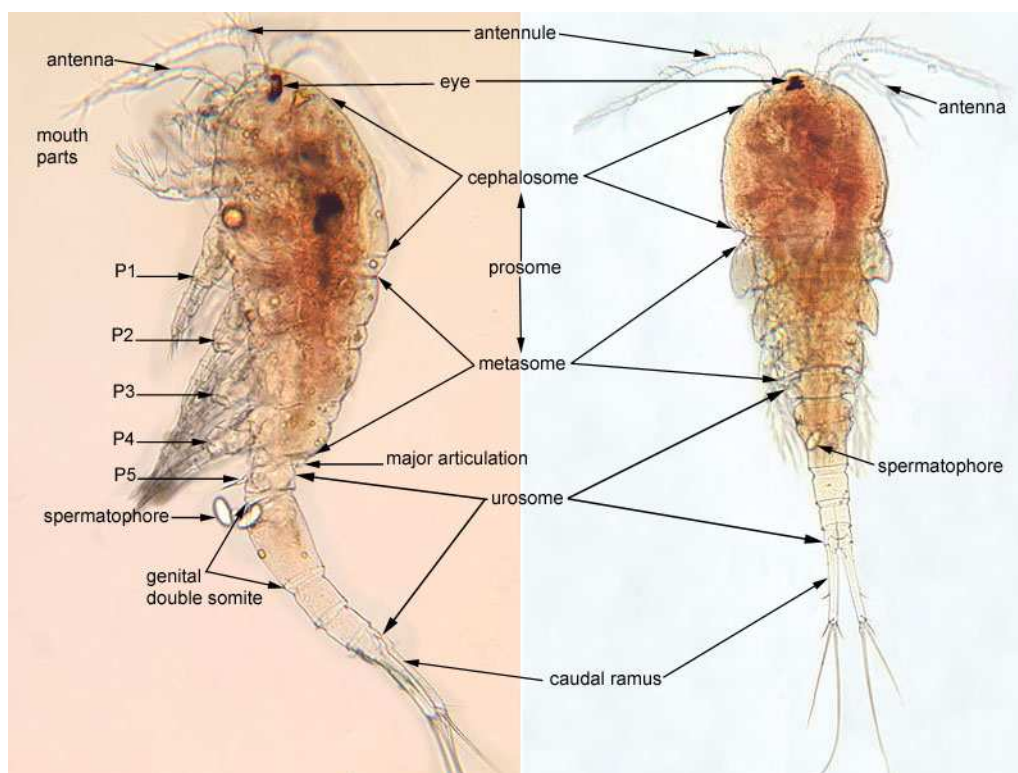
Cyclopoida rappresenta uno dei 10 ordini in cui si suddivide la classe Copepoda del subphylum Crustacea. Esso include circa 600 specie, raggruppate in 22 famiglie comprendenti sia forme a vita libera, marine e dulciacquicole, che parassite (Pesce, 2009).

Le specie dulciacquicole che interessano la presente ricerca appartengono tutte alla famiglia Cyclopidae di cui in Italia sono noti 19 generi e 120 specie/sottospecie, con una buona percentuale di forme sotterranee, stigobie o stigofile.

I rappresentanti di queste famiglie si sono ampiamente diffusi nei corpi idrici delle acque dolci, occupando un ampio range di habitat, ivi compresi quelli ipogei; essi risultano anche molto abbondanti in situazioni epibentiche ed in ambienti semiterrestri umidi. Un'accurata descrizione dei copepodi sotto ogni aspetto è ricavabile dalla pagina web <http://www.luciopesce.net/copepods/cyclopid.htm> curata dal Prof. Giuseppe Lucio Pesce dell'Università di L'Aquila.

L'adulto è generalmente piriforme suddiviso in tre regioni, cefalosoma, metasoma e urosoma.

Le appendici del cefalosoma sono inserite strutture trasformate per il nuoto, prensili e masticatorie. Comprendono un rostro, un labrum, un paio di mandibole, un paio di massilluli e di massilli, un paio di massillipedi col compito di dirigere il cibo verso l'apertura boccale. Anteriormente è il paio di antenne e di antennule. Dorsalmente è portato l'unico occhio naupliare. Nella zona del metasoma sono portate 4 paia di appendici natatorie e un paio di appendici molto ridotte.



**Fig.1** Morfologia di un ciclopoide (da Hudson et al., 2003)

L'urosoma, generalmente sprovvisto di appendici, termina con i rami furcali portanti setole.

La morfologia tipica di un adulto di ciclopoide è rappresentata in Fig.1.

Il dimorfismo sessuale è accentuato con maschi generalmente più piccoli, antennule tipicamente genicolate, prensili ed assumono una funzione paracopulatoria; nelle femmine portano le due tipiche sacche ovigere e le antennule servono per lo più ad agevolare il nuoto.

La riproduzione è sessuata con sviluppo per metamorfosi attraverso uova.

Al momento della copula il maschio fissa gli spermatozoi raccolti in una spermatofora vicino all'apertura genitale della femmina. Gli spermatozoi di un solo maschio stoccati nel ricettacolo seminale sono utilizzati per più fecondazioni e deposizioni ogni 4-7 giorni per il resto della vita della femmina.

Lo stadio adulto viene raggiunto dopo 6 età naupliari e 5 di copepodita. L'intero ciclo dura da appena una settimana a vari mesi. In molte specie, efficienti predatrici dei generi *Mesocyclops*, *Macrocyclus* e *Megacyclus*, è variabile da 1 a 4 settimane (Dieng et al., 2003). Raggiunta la maturità, gli adulti possono vivere alcuni mesi in funzione delle condizioni ambientali e della qualità e quantità di cibo (Hopp et al., 1997).

In molti copepodi dulcicoli in condizioni ambientali sfavorevoli gli stadi copepoditi secernono un rivestimento protettivo gelatinoso simile ad una cisti e diventano inattivi. Tali cisti sepolte nel fango sono adatte a sopportare periodi di essiccamento molto lunghi e consentono ai copepodi di estivare. Esse costituiscono anche un mezzo di dispersione con il fango che rimane attaccato alle zampe di uccelli e altri animali. In altre situazioni (cali di temperatura, fotoperiodo, prosciugamento) gli stadi di pre-adulto e l'adulto possono superare le avverse condizioni in uno stato quiescente o in quello di vera e propria diapausa in cui lo sviluppo si interrompe e il metabolismo rallenta al minimo vitale. Tuttavia la resistenza con forme quiescenti nel periodio di asciutta è stato osservato in alcuni generi (*Acanthocyclops* e *Dyacyclus*) mentre non è presente in specie interessanti candidate per la lotta alle zanzare (*Macrocyclus* e *Mesocyclops*) (Marten et al., 1994a).

Gli stadi di nauplio si nutrono di microrganismi come batteri e protozoi, quelli di copepodita sono generalmente onnivori. Gli adulti di molte specie di grandi dimensioni mostrano un comportamento predatorio aggressivo a carico di una vasta gamma di organismi come protozoi, rotiferi, cladoceri, altri copeodi, compresi i conspecifici, larve di insetti e perfino avannotti. La predazione consente di soddisfare un fabbisogno proteico necessario al successo riproduttivo.

I ciclopidi sono in grado di nuotare in tutte le direzioni con tipici movimenti a scatto per mezzo delle appendici toraciche e questo facilita la loro capacità predatoria.

L'attacco alla preda avviene quando questa è molto vicina e consente al copepode la sua individuazione attraverso i meccanorecettori di movimento. Se la preda è troppo grande si può assistere ad un tipico scatto di rimbalzo del ciclopoide, immediatamente dopo l'attacco.

## **POTENZIALITÀ DEI CICLOPOIDI NEI PROGRAMMI DI LOTTA ALLE ZANZARE IN ITALIA**

L'allevamento massale di copepodi ciclopidi appare praticabile ed economico (Suarez et al., 1992) e questo, assieme alle buone performances predatorie messe finora in luce in molti studi, rende tali ausiliari candidati assai interessanti contro le due principali specie di zanzare, *Culex pipiens* e *Aedes albopictus* che nelle aree urbane e periurbane italiane riescono a sfruttare raccolte d'acqua artificiali di volume variabile e a regime idrico periodico o permanente (Celli et. al., 1993; Carrieri et. al., 2008).

I Ciclopoidi potrebbero trovare impiego nelle raccolte di acqua non eliminabili come ad esempio quelle in serbatoi, fusti, bidoni e vasche stoccate con capacità fino a varie centinaia di litri per l'irrigazione degli orti familiari e nei tombini stradali.

Nelle raccolte d'acqua artificiali per uso irriguo il controllo larvale si può ottenere con semplici azioni di lotta meccanica come la chiusura dell'apertura in modo da impedire l'ingresso delle femmine di zanzara ovideponenti o il completo svuotamento settimanale. Metodi questi, da preferire all'impiego di prodotti larvicidi specialmente se l'acqua è destinata all'irrigazione di prodotti eduli.

I tombini per lo sgrondo delle acque meteoriche, rappresentano una importante tipologia di focolaio di sviluppo culicidico nell'ambiente urbano (Munstermann & Craig, 1977; Smith & Shisler, 1981; Laurent, 2005; Rey et al., 2006). In questo caso non esiste pratica alternativa all'utilizzo di formulati ad azione larvicida che devono essere impiegati con turni periodici di intervento da maggio a ottobre. I larvicidi microbiologici a base di *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, data la limitata persistenza, necessitano turni di trattamento di 7-15 giorni con pesanti aggravii economici; quelli chimici attualmente disponibili, d'altro canto, non garantiscono una persistenza d'azione superiore a circa 30 giorni richiedendo comunque costi rilevanti per le Amministrazioni Pubbliche. Tra i principi attivi più utilizzati diflubenzuron e pyriproxyfen, della classe dei cosiddetti "regolatori di crescita degli insetti" (IGR) risultano molto efficaci ma la possibilità di instaurarsi di fenomeni di resistenza nelle popolazioni di zanzare, obbliga nel medio-lungo periodo alla messa a punto di strategie alternative (Hemingway & Ranson, 2000).

La possibilità di allevare massivamente specie autoctone di ciclopoidi e condurre successivi lanci inoculativi in focolai artificiali inamovibili di *Cx. pipiens* e/o di *Ae. albopictus* potrebbe contribuire in modo importante alla lotta su questa categoria di focolai nell'ambiente urbano a vantaggio della salubrità ambientale e sanitaria, dato il rischio connesso all'impiego di larvicidi chimici.

## BIBLIOGRAFIA CITATA

- Brown M.D., Kay B.H., Hendrix J.K.. 1991. Evaluation of Australian *Mesocyclops* (Cyclopoida: Cyclopidae) for mosquito control. *J. Med. Entomol*; 28: 618-623
- Calliari D., Sanz K., Martínez M., Cervetto G., Gómez M., Basso C.. 2003. Comparison of the predation rate of freshwater cyclopoid copepod species on larvae of the mosquito *Culex pipiens*. *Medical and Veterinary Entomology*; 17(3): 399-406
- Carrieri M., Bellini R., Maccaferri S., Gallo L., Maini S., Celli G.. 2008. Tolerance thresholds for *Aedes albopictus* and *Aedes caspius* in Italian urban areas. *Journal of the American Mosquito Control Association*; 24(3): 377-386
- Celli G., Bellini R., Carrieri M.. 1994. Survey on *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) infestation in Desenzano del Garda (Brescia province-Italy). *Boll. Ist. Ent. "G. Grandi" Univ. Bologna*; 48: 211-217
- Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta. 2008.  
(<http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/Dengue/map-distribution-2005.htm>)
- Collins F.H., Washino R.K.. 1985. Insect predators. In: Chapman HC, ed. Biological control of mosquitoes *Am. Mosq. Control Assoc. Bull.*; 6, p 25-41
- Daniels C.W.. 1901. Reports of the malaria commission of the Royal Society, Series 5: 28-33

- Dieng H., Boots M., Tuno N., Tsuda Y., Takagi M.. 2002a. A laboratory and field evaluation of *Macrocyclus distinctus*, *Megacyclus viridis* and *Mesocyclops pehpeiensis* as control agents of the Dengue vector *Aedes albopictus* in a peridomestic area in Nagasaki, Japan. *Medica and Veterinary Entomology*; 16: 285-291
- Dieng H., Boots M., Tuno N., Tsuda Y., Takagi M.. 2003. Life history effects of prey choice by copepods: implications for biocontrol of vector mosquitoes. *Am. Mosq. Control Assoc.*; 19(1): 67-73.
- Gionar Y.R., Atmosoedjono S., Bangs M.J.. 2006. *Mesocyclops brevisetosus* (Cyclopoida: Cyclopoidae) as a potential biological control agent against mosquito larvae in Indonesia. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*; 22(3): 437-443
- Hemingway J., Ranson H.. 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annual Review in Entomology* ; 45: 371-391
- Hopp U., Maier G., Bleher R.. 1997. Reproduction and adult longevity of five species of planktonic Cyclopoid copepods reared on different diets: a comparative study. *Freshwater Biology*; 38: 289-300
- Hudson P.L., Lesko L.T., Reid J.W., Chriscinske M.A.. 2003. Cyclopoid copepods of the Laurentian Great Lakes. Ann Arbor, MI: Great Lakes Science Center Home Page. <http://www.glsc.usgs.gov/greatlakescopepods/Key.asp?GROUP=Cyclopoid>
- Hurlbut H.S.. 1938. Copepod observed preying on first instar larva of *Anopheles quadrimaculatus*. *J. Parasitol.*; 24:281.
- Jennings C.D., Phommasack B., Sourignadeth B., Kay B.H.. 1995. *Aedes aegypti* control in the Lao People's Democratic Republic, with reference to copepods. *Am J. Trop. Med. Hyg.*; 53: 324-330
- Kay B., Nam V., Tien T., et al. 2002. Control of *Aedes* vectors of Dengue in three provinces of Vietnam by use of *Mesocyclops* (Copepoda) and community-based methods validated by entomologic, clinical, and serological surveillance. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*; 66: 40-48
- Kay B.; Nam V.S.. 2005. New strategy against *Aedes aegypti* in Vietnam. *Lancet* ; 365: 613-617
- Kumar R., Hwang J.S.. 2006. Larvicidal efficiency of aquatic predators: A perspective for mosquito biocontrol. *Zool. Stud.*; 45(4): 447-466
- Lardeux F.J.R.. 1992. Biological control of Culicidae with the copepod *Mesocyclops aspericornis* and larvivorous fish (Poeciliidae) in a village of French Polynesia. *Med. Vet. Entomol.*; 6: 9-15
- Laurent T.H.. 2005. Problems in the treatment of residential catch basins. *Proc. Calif. Mosq. Contr. Assoc.*; 22: 73-74.
- Legner E.F.. 1995. Biological control of Diptera of medical and veterinary importance. *J. Vector Ecol.*; 20: 59-120
- Lewis D.J.. 1932. The mosquitoes of Wicken Fen. In: Gardiner JS, ed. The Natural History of Wicken Fen, Part VI. Cambridge, United Kingdom: Bowes and Bowes. p 548-559
- Marten G.G..1984. Impact of the copepod *Mesocyclops leuckarti pilosa* and the green alga *Kirchneriella irregularis* upon larval *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Bull. Soc. Vector Ecol.*; 9:1-5
- Marten G.G.. 1989. A survey of cyclopoid copepods for control of *Aedes albopictus* larvae. *Bull. Soc. Vector Ecol.*; 14:232-236
- Marten G.G.. 1990. Elimination of *Aedes albopictus* from tire piles by introducing *Macrocyclus albidus* (Copepoda, Cyclopidae). *J. Am. Mosq. Control Assoc.*; 6:689-693

- Marten G.G.. 2001. Human Ecology Basic. Concepts for Sustainable Development. Earthscan Publications Ltd; pp.224. Ed. Italiana Ecologia umana - Sviluppo sociale e sistemi naturali. Edizioni Ambiente
- Marten G.G., Astaiza R., Suarez M.F., Monje C., Reid J.W.. 1989. Natural control of larval *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) by the predator *Mesocyclops* (Copepoda: Cyclopoida). *J. Med. Entomol.*; 126: 624-627
- Marten G.G., Bordes E.S., Nguyen M.. 1994a. Use of cyclopoid copepods for mosquito control. *Hydrobiologia*; 292/293: 491-496
- Marten GG, Borjas G, Cush M, Fernfindez E, Reid JW. 1994b. Control of larval *Ae. aegypti* (Diptera: Culicidae) by cyclopoid copepods in peridomestic breeding containers. *J. Med. Entomol.*; 31: 36-44
- Marten G.G., Nguyen M., Mason B.J., Ngo G.. 2000. Natural control of *Culex quinquefasciatus* larvae in residential ditches by the copepod *Macrocyclus albidus*. *J. Vector Ecol.*; 25(1):7-15
- Marten G.G., Reid J.W.. 2007. Cyclopoid copepods. *The American Mosquito Control Association*, Inc. 23(2): 65-92
- Mogi M.. 2007. Insects and other invertebrate predators. *AMCA Bulletin*; 7: 23, Supplement to No. 2
- Munstermann L.E., Craig, Jr. G.B.. 1977. *Culex* mosquito populations in the catch basins of northern St. Joseph County, Indiana. *Proc. Indiana Acad. Sci.*; 86: 246-252
- Nam V.S., N.T. Yen, B.H. Kay, G.G. Marten, Reid J.W.. 1998. Eradication of *Aedes aegypti* from a village in Vietnam using copepod and community participation. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*; 59: 657-660
- Nam V.S., Yen N.T., Kay B.H., Marten G.G., Reid J.W.. 1998. Eradication of *Aedes aegypti* from a village in Vietnam using copepods and community participation. *Am J Trop Med Hyg*; 59: 657–660.
- Nam V.S., Yen N.T., Holynska M., Reid J.W., Kay B.H.. 2000. National progress in Dengue vector control in Vietnam: survey for *Mesocyclops* (Copepoda), *Micronecta* (Corixidae), and fish as biological control agents. *Am. J. Trop. Med. Public Health*; 62:5-10
- Pesce G.L.. 1996. Towards a revision of Cyclopinae copepods (Crustacea, Cyclopidae). *Fragmenta Entomologica*; Roma, 28(2): 189-200
- Pesce G.L.. 2009. An Electronic Update to the CHECKLIST DELLE SPECIE DELLA FAUNA ITALIANA - COPEPODA Calderini ed. Italy - 1995 and to the CHECKLIST OF THE SPECIES OF THE ITALIAN FAUNA by F. Stoch (<http://www.faunaitalia.it/checklist/>). Reperibile in: <http://www.luciopesce.net/gw/list.html>
- Rey J.R., O'Connell S., Suárez S., Menéndez Z., Lounibos L.P., Byer G.. 2004. Laboratory and field studies of *Macrocyclus albidus* (Crustacea: Copepoda) for biological control of mosquitoes in artificial containers in a subtropical environment. *Journal of Vector Ecology*; 29 (1): 124-134
- Rey J.R., O'Meara G.F., O'Connell S.M., Cutwa-Francis M.M.. 2006. Factors affecting mosquito production from stormwater drains and catch basins in two Florida cities. *Journal of Vector Ecology*; 31: 334-343
- Rivière F., Kay B.H., Klein J.M., Séchan Y.. 1987a. *Mesocyclops aspericornis* (Copepoda) and *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for biological control of *Aedes* and *Culex* vectors (Diptera: Culicidae) breeding in crab holes, tree holes, and artificial containers. *J. Med. Entomol.*; 24: 425-430
- Rivière F., Séchan Y., Kay B.H.. 1987b. The evaluation of predators for mosquito control in French Polynesia. *Arbovirus Res. Australia*; 4:150-154.



- Rivière F., Thirel R.. 1981. La prédation du Copépode *Mesocyclops leuckarti pilosa* (Crustacea) sur les larves de *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* et de *Ae. (St.) polynesiensis* (Dip.: Culicidae). Essais préliminaires d'utilisation comme agent de lutte biologique. *Entomophaga*; 26(4): 427-439
- Russell B.M., Muir L.E., Weinstein P., Kay B.H.. 1996. Surveillance of the mosquito *Aedes aegypti* and its biocontrol with the copepod *Mesocyclops aspericornis* in Australian wells and gold mines. *Med. Vet. Entomol.*; 10(2):155-60
- Saker L., Lee K., Cannito B., Gilmore A., Campbell-Lendrum D.. 2004. Globalization and infectious diseases: a review of the linkages. Geneva: WHO, 2004: [http://www.who.int/tdr/publications/training-guideline-publications/planning-social-mobilization-Dengue-fever/pdf/planning\\_Dengue.pdf](http://www.who.int/tdr/publications/training-guideline-publications/planning-social-mobilization-Dengue-fever/pdf/planning_Dengue.pdf)
- Sebastian A., Sein M.M., Thu M.M.. 1990. Suppression of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) using augmentative release of dragonfly larvae (Odonata: Libellulidae) with community participation in Yangon, Myanmar. *Bull. Entomol. Res.*; 80:223-232
- Service MW. 1993. Mosquito ecology. Essex, United Kingdom: Elsevier Sci PuN. 988 pp.
- Smith C.M., J.K. Shisler. 1981. An assessment of storm water drainage facilities as sources of mosquito breeding. *Mosq. News*; 41: 226-230
- Soumare M.K., Cilek J.E., Schreibers E.T.. 2004. Prey and size preference of *Mesocyclops longisetus* (Copepoda) for *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* larvae. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*; 20(3):305-310
- Suarez M.F., Ayala D., Nelson M.J., Reid J.W.. 1984. Hallazgo de *Mesocyclops aspericornis* (Daday) (Copepoda: Cyclopidae) depredador de larvas de *Aedes aegypti* en Anapoima-Colombia. *Biomedica*; 4: 74-76
- Suarez M.F., Marten G.G., Clark G.G.. 1992. A simple method for cultivating freshwater copepods used in biological control of *Aedes aegypti*. *J Am Mosq Control Assoc*; 8(4): 409-12
- Walton W.E.. 2007. Larvivorous fish including *Gambusia*. *J. Am. Mosq. Control Ass.*; 23(2): 184-220
- Weiss R.. 1990. Copepods make tire-heaps copacetic. *Science News*; 138:318
- Zoppi De Roa E, E. Gordon, E Montiel, L Delgado, J Berti, Ramos S.S. 2002. Association of cyclopoid copepods with the habitat of the malaria vector *Anopheles aquasalis* in the Peninsula of Paria, Venezuela. *J. Am. Mosquito Contr.*; 18: 47-51.



## MATERIALI E METODI

Allo scopo di arrivare a selezionare una o più specie di ciclopoidi candidati per la lotta biologica e valutarne la possibilità applicativa nell'ambito dei programmi di controllo delle zanzare nocive dell'ambiente urbano, la ricerca è stata sviluppata attraverso varie fasi ciascuna delle quali propedeutica a quella successiva.

### INDAGINE FAUNISTICA

Si è svolta nel periodo maggio-settembre 2006 nell'area costiera ferrarese, in quella ravennate e della pianura bolognese con campionamenti in varie tipologie di raccolte d'acqua con diverse caratteristiche in termini di qualità dell'acqua e complessità biocenotica (fossi, scoline, canali, risaie e pozze temporanee naturali in boschi litoranei) con l'obiettivo di ottenere le specie di maggiori dimensioni ( $\geq 1$  mm).

A tale scopo, concordemente con quanto suggerito da Dussart (1967) è stato utilizzato un retino immanicato a maglia di 0,2 mm. Ogni prelievo consisteva in una strisciata di circa 1 m, mantenendo il retino ad una profondità massima dalla superficie di circa 10 cm. In ciascun ambiente i campionamenti sono stati condotti sotto sponda vicino alla vegetazione ripariale, in zone senza vegetazione emergente e sommersa e dove erano presenti ammassi algali. Inoltre nello stesso ambiente i campionamenti sono stati effettuati in diversi periodi della stagione riproduttiva delle zanzare allo scopo di raccogliere le specie di ciclopoidi con più ampia attività biologica e riproduttiva.

Dal materiale raccolto con l'ausilio di una pipetta sono stati prelevati i copepodi ciclopoidi in parte conservati in formalina al 5% per la determinazione, in parte mantenuti per l'utilizzo delle prove di predazione in laboratorio.

La determinazione tassonomica è stata condotta fino al livello di specie impiegando la chiave dicotomica di Dussart (1969) integrata con la revisione della famiglia Cyclopidae suggerita da Pesce (1996) e col supporto della chiave interattiva libera reperibile nel sito <http://www.glsc.usgs.gov/greatlakescopepods/> curata da Hudson et al. (2003). La conferma tassonomica delle specie utilizzate per le prove di predazione è venuta dal Prof. Giuseppe Lucio Pesce del Dipartimento di Scienze Ambientali dell'Università degli Studi dell'Aquila.

### PROVE PRELIMINARI DI PREDAZIONE IN LABORATORIO

Le prestazioni di predazione sono state testate sottoponendo ai copepodi larve di 1<sup>a</sup> età di *Ae. albopictus* e *Cx. pipiens* e registrando il numero giornaliero di larve attaccate e uccise.

La scelta delle specie di ciclopoidi da testare è stata basata sulla loro abbondanza e frequenza di ritrovamento nei campionamenti nonché sulle loro dimensioni:

- *Thermocyclops crassus* (Fischer). Esemplari provenienti da scoline di un campo di mais di S. Giuseppe di Comacchio (FE) (fondo "Burchiola");

- *Acanthocyclops robustus* (G. O. Sars). Esemplari provenienti da un fosso perimetrale di risaia di Valle Isola presso Comacchio (FE) e da una pozza in area boscata (tenuta Orsi Mangelli, Primaro di Ravenna);
- *Megacyclops viridis* Kiefer. Esemplari provenienti da una pozza in area boscata (tenuta Orsi Mangelli, Primaro di Ravenna);
- *Macrocyclus albidus* (Jurine). Esemplari provenienti da un fosso agricolo nella campagna di Crevalcore (BO).

Ciascuna specie è stata mantenuta in allevamento per soddisfare il fabbisogno minimo di esemplari da impiegare nei saggi di predazione.

Nello specifico, ciascuna prova è stata condotta sottoponendo a un singolo copepode adulto di ciascuna specie 50 larve di 1<sup>a</sup> età di *Ae.albopictus* all'interno di contenitori cilindrici in plastica con 40 ml di acqua di acquedotto dechlorata e una piccola quantità di cibo impiegato dal laboratorio C.A.A. "G.Nicoli" di Crevalcore per lo sviluppo degli stadi preimmaginale di zanzare (biscotto per gatti) (Foto1). Ciascuna combinazione "copepode + larve di *Ae.albopictus*", è stata replicata 3-4 volte, mentre 4-10 barattoli con ciascuno soltanto 50 larve di *Ae.albopictus* fungevano da testimone. A 24 e 48 ore sono state registrate le larve sopravvissute.

**Foto 1.** Particolare dei contenitori utilizzati per le prove di predazione in laboratorio



Per *T. crassus*, *A. robustus* e *M. viridis* i tests sono stati condotti anche sottoponendo le larve a gruppi di 3 e ad esclusione di *M. viridis*, 5 copepodi.

Oltre che a *Ae. albopictus*, la prova di efficacia con *M. albidus* è stata estesa anche a *Cx. pipiens*. In questo caso, ciascuna combinazione "copepode + larve di *Ae.albopictus* " e "copepode + larve di *Cx.pipiens*" è stata replicata rispettivamente 25 e 10 volte.

Le prove sono state condotte in cella climatizzata a 26°C, 75% di UR e fotoperiodo luce:buio di 14:10 ore, presso il laboratorio del Centro Agricoltura Ambiente "G.Nicoli" di Crevalcore (BO) dove sono in allevamento a ciclo chiuso *Ae. albopictus* e *Cx. pipiens*.

I dati raccolti sono stati sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA) previa trasformazione angolare e testando la significatività della differenza fra le medie, con il test di Duncan. Il numero medio di larve predate da ogni esemplare è stato corretto con la formula di Abbott (1925).

## TECNICA DI ALLEVAMENTO

Alla base dell'applicazione di lanci inoculativi di ciclopoidi in focolai larvali su vasta scala è la disponibilità in grande numero di esemplari.

Questa parte della ricerca è stata guidata dalla finalità di mettere a punto un allevamento pilota in scala e al chiuso in modo da disporre di stock di copepodi dalla primavera, nonché di puntare a criteri di economicità nell'impianto e nella sua gestione.

L'implementazione di un allevamento pilota è stata condotta soltanto per *Macrocyclops albidus*, che è risultata specie assai interessante tra le quattro selezionate dall'indagine faunistica, sia per i risultati ottenuti in laboratorio in termini di numero di larve predate/giorno che per le caratteristiche biologiche confacenti agli ambienti potenzialmente adatti ai lanci.

Le sue caratteristiche ecologiche, come la capacità di sopportare temperature dell'acqua da 0°C a valori prossimi a 40°C (Marten, 1990), di tollerare ampi valori di pH (4,4 - 9,8) e di risultare tra le specie più resistenti alla presenza di inquinanti come potassio e nitrato (Dussart, 1969) rappresentano presupposti interessanti per prove di lotta in raccolte d'acqua artificiali.

I copepodi ciclopoidi sono facilmente allevabili in contenitori di varia dimensione e foggia, in vetro o plastica, somministrando agli stadi di preadulto alghe unicellulari (*Chlorella*, *Chilomonas*, *Chlamydomonas*), protozoi ciliati (*Paramecium*, *Euplotes*), rotiferi e cladoceri (Brandl, 1973; Rivière et al., 1987; Dussart, 1969; Suarez et al., 1992; Marten et al., 1997; Kumazawa, 2000; Kosiyachinda et al., 2003; Chansang et al., 2004; Rey & O'Connell, 2004; Park et al., 2005). Gli stadi di nauplio si cibano a carico degli organismi unicellulari di dimensione intorno a 50 µm, mentre lo stadio di copepodita e di adulto predano gli organismi di maggiori dimensioni.

Ciò presuppone colture e allevamenti in purezza di tali microrganismi mantenuti in parallelo, da utilizzare come inoculo e da aggiungere periodicamente nell'acqua di allevamento dei copepodi. Nel caso di utilizzo di protozoi ciliati, occorre garantirne lo sviluppo che avviene a carico di flora batterica spontanea a sua volta cresciuta su di un substrato organico quale latte, cariossidi bollite di grano o soia o orzo, foglie di lattuga, paglia di riso bollita con cibo secco per pesci o lievito di birra.

Tutto ciò presuppone un certo impegno organizzativo e di manodopera ed espone al continuo rischio di perdere la purezza della colonia.

Se il cibo vivo per i ciclopoidi potesse essere costituito da un mix di vari microrganismi, con predominanza di ciliati e rotiferi, in grado di svilupparsi direttamente nell'acqua di allevamento mediante la somministrazione periodica di cibo standard e pronto all'uso, l'allevamento risulterebbe più facile ed economico. In altre parole obiettivo di questa parte della ricerca è stato quello di impostare l'allevamento creando e mantenendo nei contenitori una catena alimentare permanente.

A tale scopo è stato condotto uno studio di laboratorio per verificare la produttività in termini di adulti di *M. albidus* con differenti sistemi di allevamento:

1. Basato solo utilizzando *Paramecium* col metodo proposto da Rey & O'Connell (2004);
2. Utilizzando una popolazione mista di protozoi e rotiferi ottenuti prelevando acqua da un acquario con cibo secco per gatti nelle vasche di riproduzione di *M. albidus*.

### **1<sup>a</sup> prova di allevamento**

Femmine di *M.albidus* con ovisacchi sono state collocate singolarmente, in bicchieri di plastica trasparente con 100 ml di acqua di rubinetto decolorata da 5 giorni. Un separatore costituito da rete a maglia di 0,2 mm consentiva di mantenere isolata la femmina permettendone agevolmente il suo allontanamento.

In 5 barattoli è stato aggiunto circa 0,01 mg di cibo impiegato nel laboratorio di CAA per l'allevamento degli stadi preimmaginali dei culicidi, costituito da cibo secco triturato per gatti a base di manzo, fegato e verdure (Friskiess<sup>®</sup>, Italia S.p.a.) e 5 ml di acqua proveniente da acquario (**CR**). In altri 5 invece sono stati aggiunti 10 ml di brodo contenente *Paramecium* spp. (**CP**) ottenuto secondo uno dei metodo proposto da Streble & Krauter (2002).

I contenitori sono stati mantenuti in cella climatizzata a  $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ , 75% di UR e fotoperiodo luce:buio di 14:10 ore.

L'osservazione dell'andamento della crescita nei contenitori avveniva quotidianamente e quando l'acqua appariva non più torbida veniva aggiunto, a seconda, 5 ml di *Paramecium* o cibo secco per gatti. Appena la femmina perdeva gli ovisacchi veniva allontanata in modo da evitare il possibile cannibalismo nei confronti della prole.

La prova è stata replicata due volte e il conteggio dei Copepodi di ciascun barattolo è stato effettuato al 18<sup>esimo</sup> giorno dall'inizio della prova.

### **2<sup>a</sup> prova di allevamento**

Il confronto è stato fatto fra tre differenti tesi, ciascuna replicata tre volte e costituite dalle seguenti combinazioni, in 5 l di acqua decolorata contenuta in bacinelle di plastica:

- 5 femmine con ovisacchi di *M.albidus* assieme a 50 ml di inoculo di protozoi ciliati e rotiferi e 10 cariossidi di grano (**G**);
- 5 femmine con ovisacchi di *M.albidus* assieme a 50 ml di inoculo di protozoi ciliati e rotiferi e 0,5 g di cibo secco triturato per gatti (=0,1g/l) (**Cr**);
- 5 femmine con ovisacchi di *M.albidus* assieme a 50 ml di inoculo di protozoi ciliati e rotiferi e a 10 ml di latte (**L**)

Le bacinelle sono state mantenute all'interno a temperatura ambiente ( $25-32^{\circ}\text{C}$ ).

A 7 e a 20 giorni dall'inizio della prova in ciascuna bacinella è stata misurata la concentrazione di ossigeno mediante un ossimetro portatile.

Al 20<sup>esimo</sup> giorno dall'inizio sono stati contati i Copepodi, giovani e adulti, in ciascuna bacinella.

### **3<sup>a</sup> prova di allevamento**

Allo scopo di ottenere un ulteriore dato sulla capacità riproduttiva di *M.albidus* allevata fornendo il mix di microrganismi e cibo secco triturato per gatti come nella "**2<sup>a</sup> prova di allevamento**", in vaschette contenenti 500 ml di acqua decolorata di rubinetto e una femmina con ovisacchi sono stati aggiunti 0,05 mg di cibo secco per gatti, 40 ml di inoculo di protozoi e rotiferi.

Le vaschette sono state mantenute in cella climatizzata a  $26\pm 1^{\circ}\text{C}$  e fotoperiodo luce:buio di 14:10 ore. Quotidianamente ciascuna vaschetta veniva visionata e se il copepode aveva perso gli ovisacchi veniva allontanato. Al 18<sup>esimo</sup> giorno dall'allontanamento della femmina il contenuto di ciascuna vaschetta è stato conteggiato.

## PROVE DI EFFICACIA DI *MACROCYCLOPS ALBIDUS* IN CONDIZIONI DI SEMICAMPO E DI CAMPO

Questa parte della ricerca ha riguardato prove di semicampo e di campo con l'obiettivo di ottenere dati sull'efficienza del controllo di *M.albidus* nei confronti della popolazione culicidica selvatica che colonizza i serbatoi per lo stoccaggio di acqua per l'irrigazione degli orti e i tombini stradali nonché sulla capacità del copepode di colonizzare stabilmente tali tipologie di focolai larvali.

### Prova di efficacia in semicampo in bidoni da 220 l di capacità

La prova è stata condotta all'aperto nel periodo aprile-ottobre del 2007 e del 2008 utilizzando bidoni di plastica da 220 l di capacità, appoggiati al suolo in zona ombreggiata da alberi, nell'area cortiliva della sede di CAA a Ronchi di Crevalcore (BO) (Foto 2).

**Foto 2.** Bidoni utilizzati per la prova in condizioni di semicampo nel 2007 e 2008



In 10 bidoni sono stati introdotti 200 l di acqua di rubinetto e 50 g di fieno/bidone per accelerare e migliorare l'attrazione all'ovideposizione da parte delle femmine di zanzara.

A sette giorni dall'introduzione dell'acqua (25/4/07) in 6 bidoni sono stati introdotti adulti di *M.albidus*: in 3 bidoni 100 adulti (COP100), in altri tre 500 (COP500); 4 bidoni sono stati lasciati senza copepodi come testimone (Test). La distribuzione dei bidoni con copepodi e dei bidoni testimone è stata lasciata al caso.

A partire dal 10 maggio, ogni 2 settimane è stato fatto il campionamento di larve e pupe di zanzare e di copepodi da ciascun bidone. Allo scopo si è utilizzato un retino immanicato (13 x 15 cm, a maglia di 0,1 mm), effettuando con movimento circolare un unico prelievo e interessando lo strato superiore di acqua fino alla profondità di 30-40 cm. Il contenuto del retino, versato in una vaschetta bianca, era immediatamente analizzato annotando il numero di larve e/o pupe, la specie, e stimando il numero di copepodi (copepoditi e adulti). Nel 2007 complessivamente sono stati eseguiti 12 campionamenti di cui l'ultimo effettuato il 22 ottobre.

Gli stessi 10 bidoni utilizzati nello studio 2007, lasciati nella collocazione originale e mai svuotati, a partire dal 25 aprile 2008 (data corrispondente a un anno esatto dall'introduzione dei ciclopidi) sono



stati mantenuti sotto osservazione con campionamenti quindicinali, condotti fino a ottobre, con la stessa modalità dell'anno prima.

Complessivamente sono stati eseguiti 14 campionamenti di cui l'ultimo effettuato il 28 ottobre.

Durante il periodo di prova è stata registrata la pioggia e quotidianamente la temperatura, minima e massima, ambientale e dell'acqua.

Le larve (e tra queste soltanto quelle di 3<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup> età che si presuppone non più soggette alla predazione da parte dei ciclopoidi) e delle pupe di zanzara ottenute dal campionamento sono state sottoposte ad analisi della varianza (ANOVA a blocchi) seguita dal Test di Duncan per la separazione delle medie.

Parallelamente a tale sperimentazione, in una zona sempre esposta al sole della stessa area del piazzale di CAA, a partire dall'inizio di giugno 2007 sono stati collocati 3 bidoni ciascuno inoculato con 100 esemplari di *M.albidus*. Anche in questo caso sono stati condotti campionamenti quindicinali con le stesse modalità sopradescritte e giornalmente veniva registrata la temperatura minima e massima dell'acqua a 12-20 cm di profondità.

### **Prova di efficacia in campo in serbatoi per l'acqua irrigua degli orti**

La prova è stata condotta a partire dalla metà di agosto 2008 interessando 15 serbatoi di varia foggia e capacità, variabile tra 200 e 600 l, utilizzati per stoccare acqua orti famigliari nel comune di Crevalcore (BO) (Foto 3). L'acqua stoccata proveniva nella maggior parte dei casi (79%) da pozzi artesiani o era intercettata dalle piogge (21%). Ai proprietari dei serbatoi è stato chiesto di gestire il prelievo dell'acqua e i rifornimenti come da abitudine con l'unica raccomandazione di non svuotarli mai completamente.

Appena terminato il primo campionamento larvale con retino (18 agosto 2008), in 8 contenitori sono stati immessi 100 esemplari di *M.albidus* e una compressa larvicida di VECTOBAC DT (*Bacillus thuringiensis israelensis*-*B.t.i.*-); nei restanti 7 è stata soltanto immessa la compressa di *B.t.i.*. Il campionamento larvale è quindi proseguito con cadenza settimanale fino all'8 ottobre 2008.

**Foto 3.** Esempi di serbatoi coinvolti nella prova in campo





## Prove di efficacia in campo in tombini stradali

### 1<sup>a</sup> prova 2007

Normalmente, i tombini utilizzati per lo sgrondo dell'acqua meteorica sono in grado di mantenere, alla massima capacità, volumi anche superiori a 50 l di acqua che tipicamente è caratterizzata da elevata presenza di materiale organico in sospensione e nel fango di fondo. Tale ristagno è sfruttato dalle due specie di zanzara urbane più importanti dei nostri ambienti, *Aedes albopictus* e *Culex pipiens*.

La bibliografia non riporta nessun dato sulle prestazioni di *M. albidus* in tale tipologia di focolaio larvale, e nel contempo appaiono esigue le informazioni inerenti altre specie di ciclopidi (Kay et al., 2002; Suarez-Rubio & Suarez, 2004).

La prova è stata condotta a Marano di Castenaso (BO) dal 9 luglio al 22 ottobre interessando 20 tombini scelti a caso lungo strade con e senza alberi lungo i bordi.

In 10 tombini (9 luglio) sono stati introdotti 100 copepod/tombino; 10 tombini sono stati utilizzati come testimone. La distribuzione dei tombini con copepod e dei tombini testimone è stata casuale.

Prima dell'introduzione dei ciclopidi e successivamente ogni 2 settimane, da ogni tombino mediante *dipper* immanicato da 0,5 l, si prelevavano due campioni di acqua dopo aver atteso almeno 120" dopo l'apertura della grata e tra un prelievo e il successivo. La presenza di stadi preimmaginali di culicidi veniva registrata secondo tre categorie per ogni specie: larve 1<sup>a</sup>-2<sup>a</sup> età, larve di 3<sup>a</sup>-4<sup>a</sup> età, pupe. Veniva inoltre registrato il numero di copepod prelevati.

Ad ogni data di rilevamento veniva misurata a campione la quantità di ossigeno disciolto mediante ossimetro. Inoltre sono state registrate le temperature di minima e massima giornaliere e le precipitazioni durante l'intera durata del periodo di prova.

### 2<sup>a</sup> prova 2008

Dall'esperienza 2007 è stato possibile ottenere utili elementi di valutazione, fondamentali per tentare una seconda prova esaustiva circa la possibilità concreta di impiego dei ciclopidi nei tombini stradali.

Per evitare che l'elevato carico organico dell'acqua e con esso la scarsità di ossigeno disciolto, possa rappresentare un fattore fondamentale di ostacolo alla sopravvivenza dei copepod, la prova è stata condotta su un campione di tombini stradali nei quali era stato condotto di recente la rimozione del fango di fondo. In questo modo la pulizia completa del tombino mediante l'asportazione dei sedimenti, operazione necessaria a garantirne uno sgrondo efficiente, poteva rappresentare un'operazione utile al miglioramento della qualità dell'acqua a vantaggio perciò della capacità di colonizzazione stabile da parte dei copepod.

La prova è stata condotta a partire dal 26 aprile 2008 in 145 tombini stradali, sottoposti nell'arco dei precedenti 6 mesi a completa pulizia, in sette vie dell'abitato di San Carlo in comune di San'Agostino (FE).

Ogni tombino è stato marcato apponendo con vernice indelebile un codice numerico identificativo e il 26 aprile in ciascuno di essi, sono stati introdotti circa 50 esemplari di *M. albidus*.

Il 28 giugno è stata effettuata una seconda introduzione di copepodì sempre alla dose di circa 50 copepodì per tombino. Assieme a questa seconda introduzione di copepodì ogni tombino è stato trattato con una compressa larvicida di VECTOBAC DT (*Bacillus thuringiensis israelensis* -B.t.i.-).

Alla data della prima introduzione dei copepodì (26 aprile) e ogni due settimane fino al 5 agosto, 30 tombini scelti casualmente su tutte le vie venivano campionati con *dipper* e registrate le larve e le pupe di zanzara presenti suddivise per specie, secondo tre categorie: "larve 1a-2a età", "larve di 3a-4a età", "pupe". Veniva inoltre registrata la presenza o l'assenza di copepodì nel campione.

Durante il periodo di prova inoltre sono state registrate le precipitazioni.

## BIBLIOGRAFIA CITATA

- Abbott W.S.. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.*; 18: 265-267
- Brandl Z.. 1973. Laboratory culture of cyclopoid copepods on a definite food. *Vestnik s. spol. zool.*; 37: 81-88
- Chansang U., Bhumiratana A., Pattamaporn Kittayapong P.. 2004. Combination of *Mesocyclops thermocyclopoides* and *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*: A better approach for the control of *Aedes aegypti* larvae in water containers. *Journal of Vector Ecology*; 29(2): 218-226
- Dussart B.H.. 1967. Les Copépodes des Eaux Continentales d'Europe Occidentale. Tome I: Calanoïdes et Harpacticoïdes. N. Boubée et Cie., Paris. 500 pp.
- Dussart, B.H.. 1969. Les Copépodes des Eaux Continentales d'Europe Occidentale. Tome II: Cyclopoïdes et Biologie. N. Boubée et Cie., Paris. 292 pp.
- Hudson, Patrick L., Lynn T. Lesko, Janet W. Reid, and Margret A. Chriscinske. 2003. Cyclopoid copepods of the Laurentian Great Lakes. Ann Arbor, MI: Great Lakes Science Center Home Page. <http://www.glsc.usgs.gov/greatlakescopepods/Key.asp?GROUP=Cyclopoid>
- Kay B.H., Lyons S.A., Holt J.S., Holynska M., Russell B.M.. 2002. Point source inoculation of *Mesocyclops* (Copepoda: Cyclopidae) gives widespread control of *Ochlerotatus* and *Aedes* (Diptera: Culicidae) immatures in service manholes and pits in North Queensland, Australia. *J. Med. Entomol.*; 39(3): 469-474
- Kosiyachinda P., Bhumiratana A., Kittayapong P.. 2003. Enhancement of the efficacy of a combination of *Mesocyclops aspericornis* and *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* by community-based products in controlling *Aedes aegypti* larvae in Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*; 69(2): 206-212
- Kumazawa H.. 2000. Laboratory maintenance of *Eucyclops serrulatus* (Copepoda: Cyclopoida). *Parasitol. Int.*; 49(3): 189-93
- Marten G.G., Nguyen M., Thompson G., Bordes E.S.. 1997. Copepod production and application for mosquito control. New Orleans, LA: New Orleans Mosquito and Termite Control Board. 43 pp.
- Marten G.G.. 1990. Evaluation of Cyclopoid copepods for *Aedes albopictus* control in tires. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*; 6(4): 681-688.

- Park S-H., Chang C.-Y.; Sung-Shik Shin S.-S.. 2005. A new culture system for in situ observation of the growth and development of *Eucyclops serrulatus* (Copepoda: Cyclopoida). *The Korean Journal of Parasitology*; 43(4): 141-147
- Pesce G.. 1996. Towards a revision of Cyclopinae copepods (Crustacea, Cyclopidae). *Fragmenta Entomologica*; Roma, 28(2): 189-200
- Rey J.J., O'Connell S.. 2004. Rearing Copepods for Mosquito Control. ENY-697, one of a series of the Entomology and Nematology Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. EDIS Web Site at <http://edis.ifas.ufl.edu>.
- Streble H., Krauter D.. 2002. Atlante dei microrganismi acquatici – La vita in una goccia d'acqua. Franco Muzzio Editore; pp. 334
- Suarez M.F., Marten G.G., Clark G.G.. 1992. A simple method for cultivating freshwater copepods used in biological control of *Aedes aegypti*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*; 8(4): 409-12
- Suarez-Rubio M., Suarez M.E.. 2004. The use of the copepod *Mesocyclops longisetus* as a biological control agent for *Aedes aegypti* in Cali, Colombia. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*; 20(4):401-4
- Vijverberg J. 1989. *Culture techniques for studies on the growth, development and reproduction of copepods and cladocerans under laboratory and in situ conditions: a review. Freshwater Biology*; 21(3): 317-323

## RISULTATI

### INDAGINE FAUNISTICA

La specie rinvenuta in tutti i corpi idrici campionati nell'area agricola di Comacchio e in una pozza temporanea nel bosco litoraneo in comune di Ravenna è stata *Megacyclops viridis* Kiefer, 1960 (Cyclopidae, Cyclopinae). Si tratta di una specie banale e cosmopolita (Australia esclusa), la cui femmina è lunga 1,5-3 mm, il maschio 1,4-1,6 mm frequente in tutti i tipi di acque, sia epigee che ipogee in qualità di stigofila (Stock, 1995). Nella checklist delle specie italiane è riportata come specie diffusa in tutta la penisola, isole comprese (Stock, 2003). In Europa, *M. viridis* è tipico dei ristagni temporanei o permanenti, di ridotte o ampie dimensioni (Dussart, 1969).

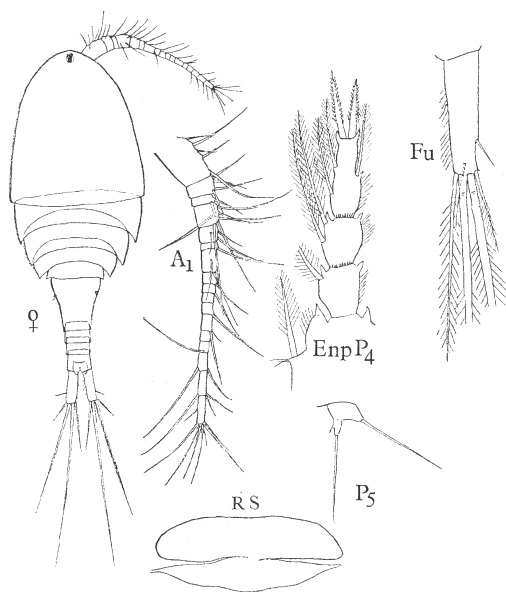
Nelle scoline di un appezzamento di mais della campagna di Comacchio è stato raccolto *Thermocyclops crassus* (Fischer, 1853) (Cyclopidae, Cyclopinae), specie cosmopolita, segnalata in Europa, dalla Norvegia meridionale alla Spagna e al Portogallo, in Asia, Africa, America e Australia. In Italia è segnalata al nord e al sud (Stock, 2003). La femmina raggiunge è di 0,8-1 mm, il maschio 0,6 mm. E' una specie termofila tollerante di livelli di salinità fino a 7,2‰, diffusa nelle raccolte d'acqua libera ricche di vegetazione.

In risaia, in tutti i campionamenti e in un fosso perimetrale ad una piana presso Comacchio è stato rinvenuto *Acanthocyclops (Acanthocyclops) robustus* (G.O. Sars, 1863) (Cyclopidae, Cyclopinae). Anch'essa specie cosmopolita segnalata in stagni, laghi e in acque debolmente correnti e sotterranee come stigofila (Stoch, 1989). In Italia è segnalata in tutta la penisola isole comprese (Stock, 2003). La femmina è lunga 1,1-1,5 mm, il maschio 0,8 mm.

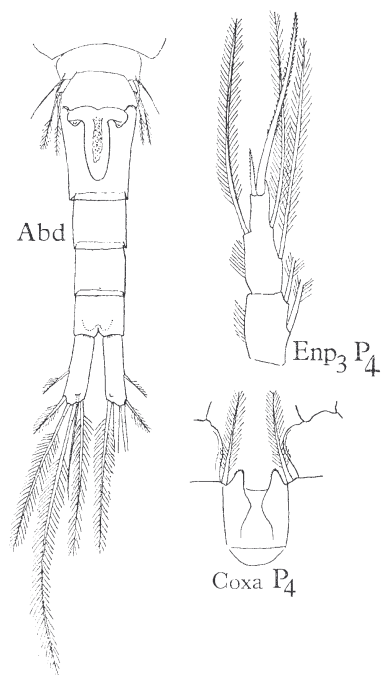
Infine in un fossato allagato per pioggia nella campagna di Crevalcore è stato campionato *Macrocyclus albidus* (Jurine, 1820) (Cyclopidae, Eucyclopinae). Anch'essa specie cosmopolita delle aree temperate è frequente negli ambienti epigei di varie dimensioni con acque sia correnti che lentiche mentre nelle acque sotterranee è una specie stigossena. La femmina è lunga 1,5-2,5 mm, il maschio 1-1,3 mm.

Le caratteristiche morfologiche salienti di ciascuna specie sono rappresentate nelle Figg. 1, 2, 3 e 4 (da Dussart, 1969).

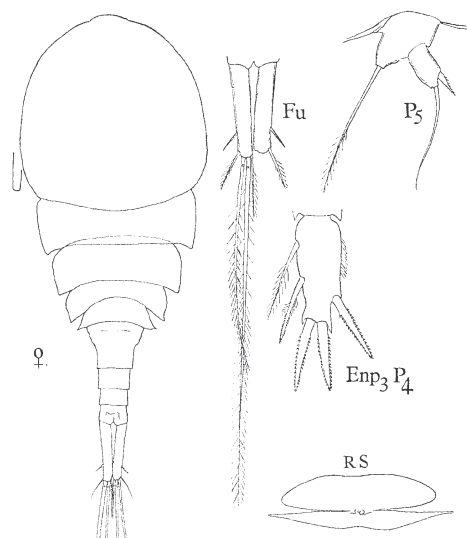
**Fig.1** *Megacyclops viridis*



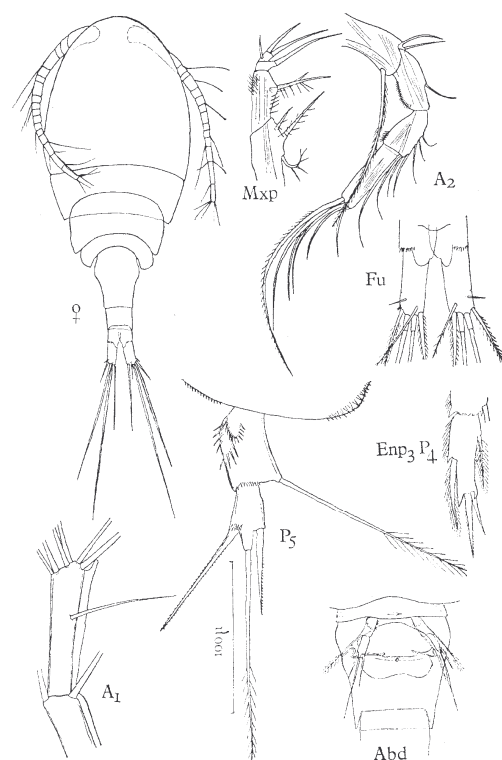
**Fig.2** *Thermocyclops crassus*



**Fig.3** *Acanthocyclops (Acanthocyclops) robustus*



**Fig.4** *Macrocyclus albidus*



**A1:** antennula

**A2:** antenna

**Abd:** segmento addominale

**EnpP4:** endopodite quarta zampa

**Fu:** branche della furca

**Mxp:** maxillipedi

**P4:** quarta zampa toracica

**P5:** quinta zampa toracica

**RS:** ricettacolo seminale

## PROVE PRELIMINARI DI PREDAZIONE IN LABORATORIO

### *Thermocyclops crassus*

Un singolo esemplare di *T. crassus* ha determinato una mortalità media di 85,09% a 48 ore, predando nelle prime 24 ore, la media di 21 larve e, a 48 ore, 42 larve.

Tre esemplari messi insieme a 48 ore hanno determinato una mortalità media del 90,35% predando, a 24 ore, 38 larve; tra 24 e 48 ore 7 larve; infine, a 48 ore, 45 larve.

Cinque esemplari hanno determinato una mortalità media a 48 ore del 94,74% predando, a 24 ore mediamente 44 larve; 3 larve tra 24 e 48 ore e, infine, a 48 ore complessivamente la media di 47 larve (Tab.1; Fig.5 e Fig.6).

L'analisi statistica dei dati a 24 ore mostra una differenza significativa della percentuale media di predazione di tutte e tre le tesi rispetto al testimone. Una differenza significativa è rilevabile soltanto tra 1 e 5 copepodi ( $p \leq 0,001$ ) (Tab.2). A 48 ore invece si osserva una differenza significativa della percentuale media di predazione delle tre tesi rispetto al testimone, mentre tra 1, 3 e 5 copepodi non vi è differenza significativa.

**Tab.1.** Riepilogo dei risultati ottenuti nella prova di predazione in laboratorio sottoponendo a 1 (C1), 3 (C3) e 5 (C5) esemplari di *Thermocyclops crassus* 50 larve di 1<sup>a</sup> età di *Aedes albopictus*. Lettere (a, b, c) diverse indicano differenza significativa ( $p \leq 0,001$ ); **DS**= Deviazione Standard

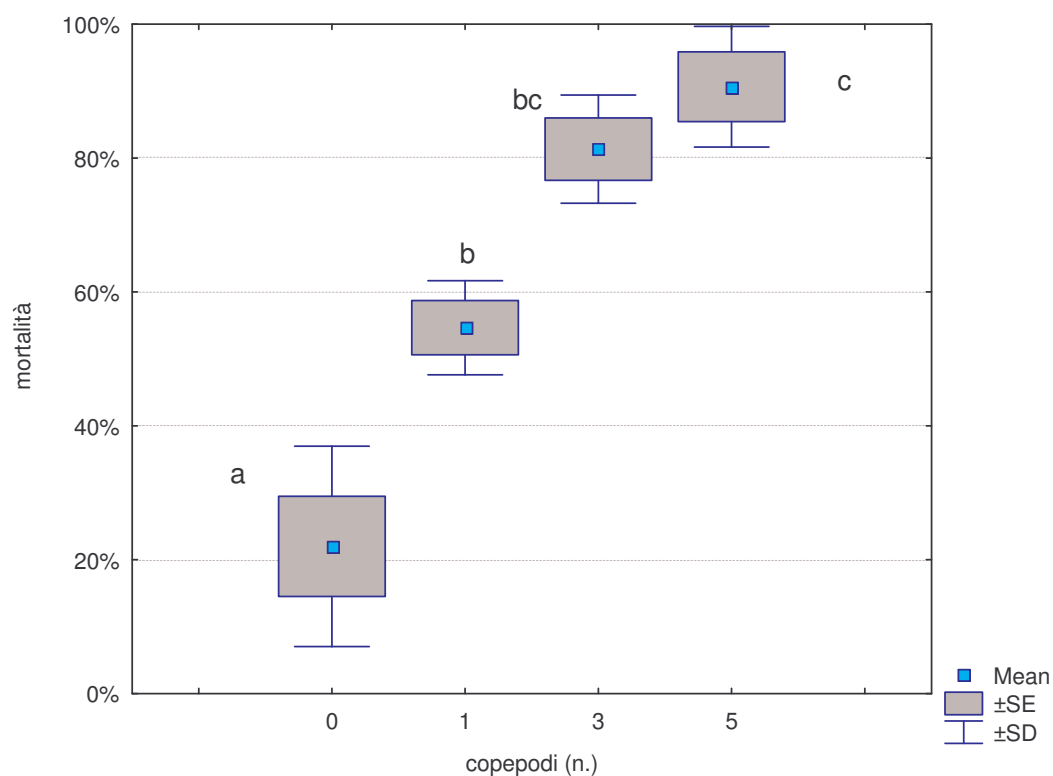
Tesi	N	% di predazione a 24 ore		% di predazione da 24 a 48 ore		% predazione totale a 48 ore	
		Corretta		Corretta		Corretta	
		Media $\pm$ DS	con Abbott	Media $\pm$ DS	con Abbott	Media $\pm$ DS	con Abbott
<b>C1</b>	3	54,67 $\pm$ 0,0702 <b>a</b>	41,88	74,03 $\pm$ 12,60	74,34	88,67 $\pm$ 5,03 <b>a</b>	85,09
<b>C3</b>	3	81,33 $\pm$ 0,0808 <b>ab</b>	76,07	64,29 $\pm$ 18,90	59,68	92,67 $\pm$ 6,11 <b>a</b>	90,35
<b>C5</b>	3	90,67 $\pm$ 9,02 <b>b</b>	88,03	66,67 $\pm$ 47,14	56,02	96,00 $\pm$ 6,93 <b>a</b>	94,74
<b>Mortalità Testimone</b>	4	22,00 $\pm$ 14,97 <b>c</b>		2,17 $\pm$ 2,90		24,00 $\pm$ 12,33 <b>b</b>	

**Tab.2.** Analisi della varianza (ANOVA) - mortalità alle diverse combinazioni di *T. crassus*

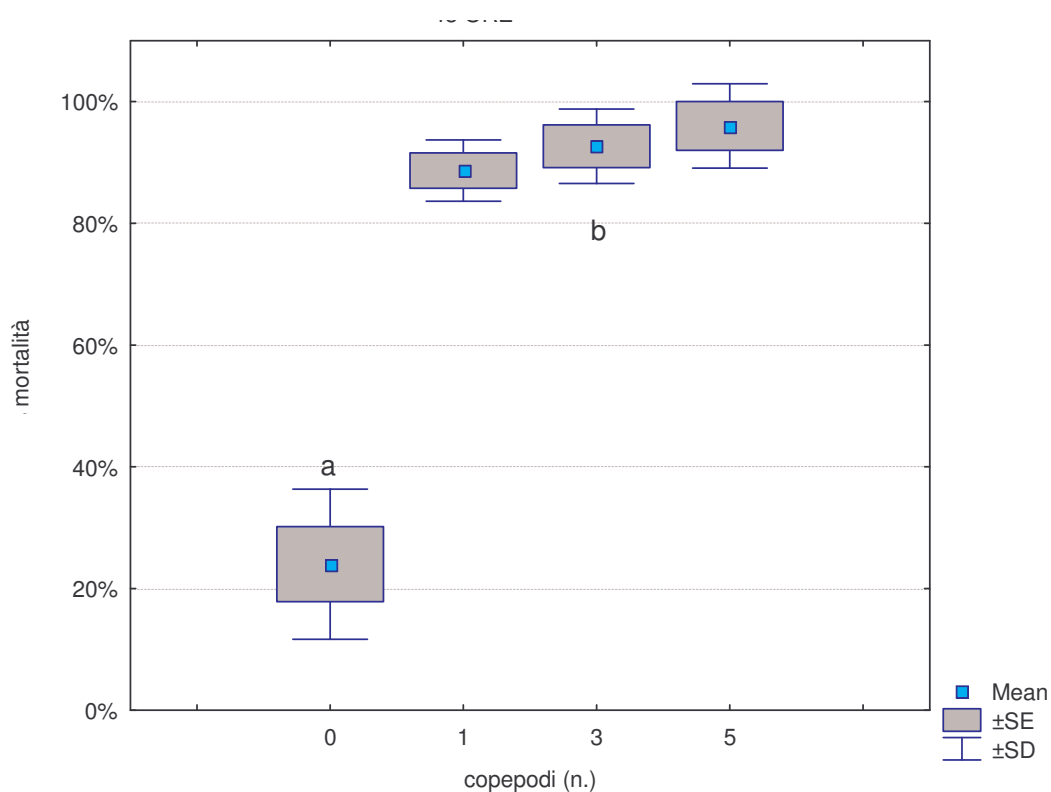
	Effect			Error			F	P
	SS	df	MS	SS	df	MS		
<b>Arcsen24</b>	1,477961	3	0,492654	0,282561	9	0,031396	15,69179	0,000641
<b>Arcsen24_48</b>	1,942031	3	0,647344	1,437211	9	0,159690	4,05375	0,044521
<b>Arcsen48</b>	1,998421	3	0,666140	0,200422	9	0,022269	29,91320	0,000052



**Fig.5** Predazione media ottenuta a 24 ore sottoponendo a 1, 3 e 5 esemplari di *Thermocyclops crassus* 50 larve di 1<sup>a</sup> età di *Aedes albopictus*. Lettere (**a**, **b**, **c**) diverse indicano differenza significativa ( $p \leq 0,001$ )



**Fig.6** Predazione media ottenuta a 48 ore sottoponendo a 1, 3 e 5 esemplari di *Thermocyclops crassus* 50 larve di 1<sup>a</sup> età di *Aedes albopictus*. Lettere (**a**, **b**, **c**) diverse indicano differenza significativa ( $p \leq 0,001$ )



***Acanthocyclops robustus***

Un esemplare di *A. robustus* ha effettuato una predazione media cumulata a 48 ore soltanto del 42,66% (corretta con Abbott) che corrisponde a una media di 18 larve nelle prime 24 ore e di 21 a 48 ore.

Tre esemplari insieme hanno invece determinato a 48 ore una mortalità media cumulata del 60,32% predando 26 larve e 30 a 24 ore.

Infine 5 esemplari hanno portato a una mortalità media a 24 e 48 ore rispettivamente del 67,28% e del 69,02% predando mediamente circa 34 larve (Tabb.3 e 4; Figg.7 e 8).

La differenza di predazione è statisticamente significativa soltanto tra un esemplare rispetto a tre e cinque.

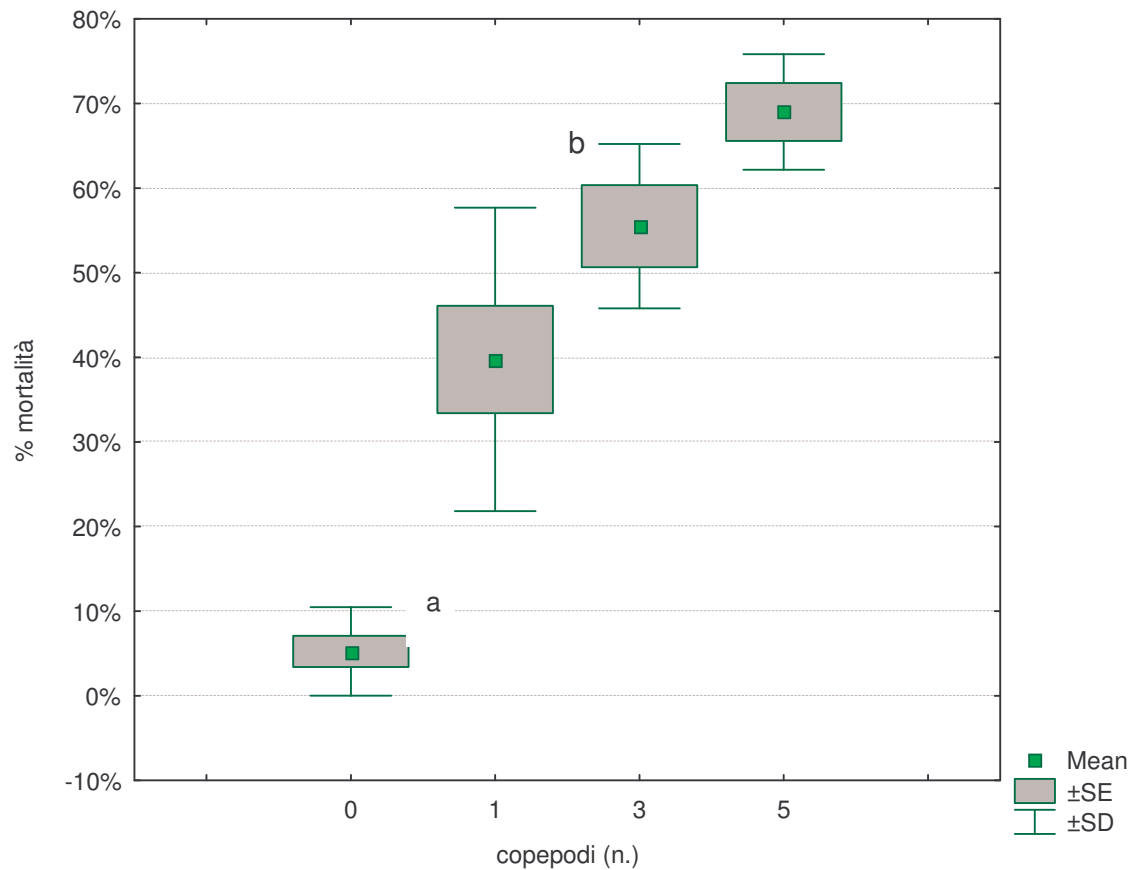
**Tab.3** Riepilogo dei risultati ottenuti nella prova di predazione in laboratorio sottoponendo a 1 (**C1**), 3 (**C3**) e 5 (**C5**) esemplari di *Acanthocyclops robustus* 50 larve di 1<sup>a</sup> età di *Aedes albopictus*. Lettere (**a**, **b**, **c**) diverse indicano differenza significativa ( $p \leq 0,001$ ); **DS**= Deviazione Standard

Tesi	N	% di predazione a 24 ore		% predazione totale a 48 ore	
		Media $\pm$ DS	Corretta con Abbott	Media $\pm$ DS	Corretta con Abbott
<b>C1</b>	8	39,75 $\pm$ 7,93 <b>b</b>	36,41	47,25 $\pm$ 16,90 <b>b</b>	42,66
<b>C3</b>	4	55,50 $\pm$ 9,71 <b>b</b>	53,03	63,50 $\pm$ 8,70 <b>bc</b>	60,32
<b>C5</b>	4	69,00 $\pm$ 6,83 <b>b</b>	67,28	71,50 $\pm$ 4,12 <b>c</b>	69,02
<b>Mortalità Testimone</b>	8	5,25 $\pm$ 5,23 <b>a</b>		8,00 $\pm$ 6,42 <b>a</b>	

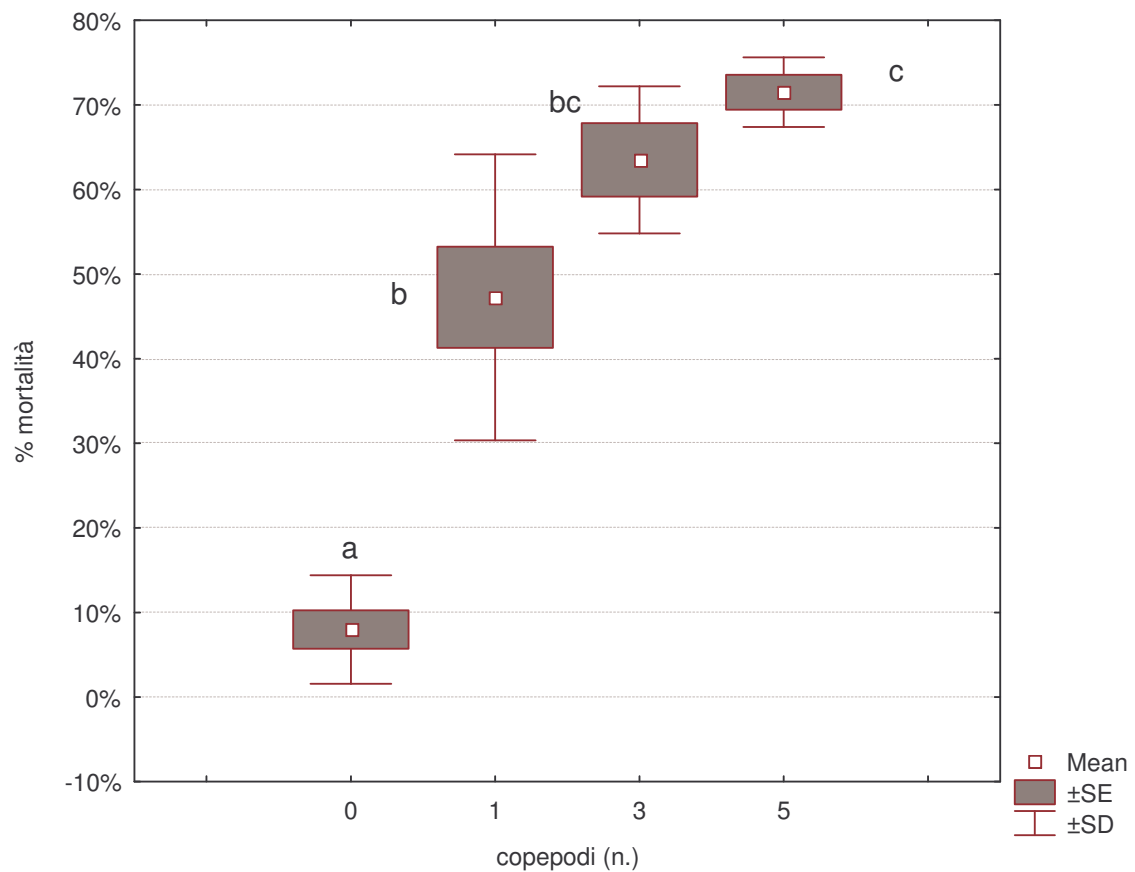
**Tab.4** Analisi della varianza (ANOVA) - mortalità alle diverse combinazioni di *A.robustus*

	Effect			Error			F	P
	SS	Df	MS	SS	df	MS		
<b>Arcsen24</b>	2,272060	3	0,757353	0,478788	20	0,023939	31,63627	0,000000
<b>Arcsen24_48</b>	0,242933	3	0,080978	0,537410	20	0,026871	3,01363	0,054156
<b>Arcsen48</b>	2,148065	3	0,716022	0,396698	20	0,019835	36,09911	0,000000

**Fig. 7** Predazione media ottenuta a 24 ore sottoponendo a 1, 3 e 5 esemplari di *Acanthocyclops robustus* 50 larve di 1<sup>a</sup> età di *Aedes albopictus*. Lettere (a, b) diverse indicano differenza significativa ( $p \leq 0,001$ )



**Fig.8** Predazione media ottenuta a 48 ore sottoponendo a 1, 3 e 5 esemplari di *Acanthocyclops robustus* 50 larve di 1<sup>a</sup> età di *Aedes albopictus*. Lettere (a, b, c) diverse indicano differenza significativa ( $p \leq 0,001$ )



**Megacyclops viridis**

Un esemplare di *M. viridis* ha condotto ad una predazione media cumulata a 48 ore dell'86,78%, perciò complessivamente è stato in grado di predare 43 larve a 48 ore e 40 larve a 24 ore. Tre copepodì insieme hanno predato mediamente 48 larve dopo due giorni, 47 a 24 ore, portando ad una mortalità media cumulata del 96,55% e del 94,25% rispettivamente. Tali valori non sono statisticamente differenti tra le due tesi mentre entrambe lo sono nei confronti del testimone sia a 24 che a 48 ore (Tabb.5 e 6; Figg.9 e 10).

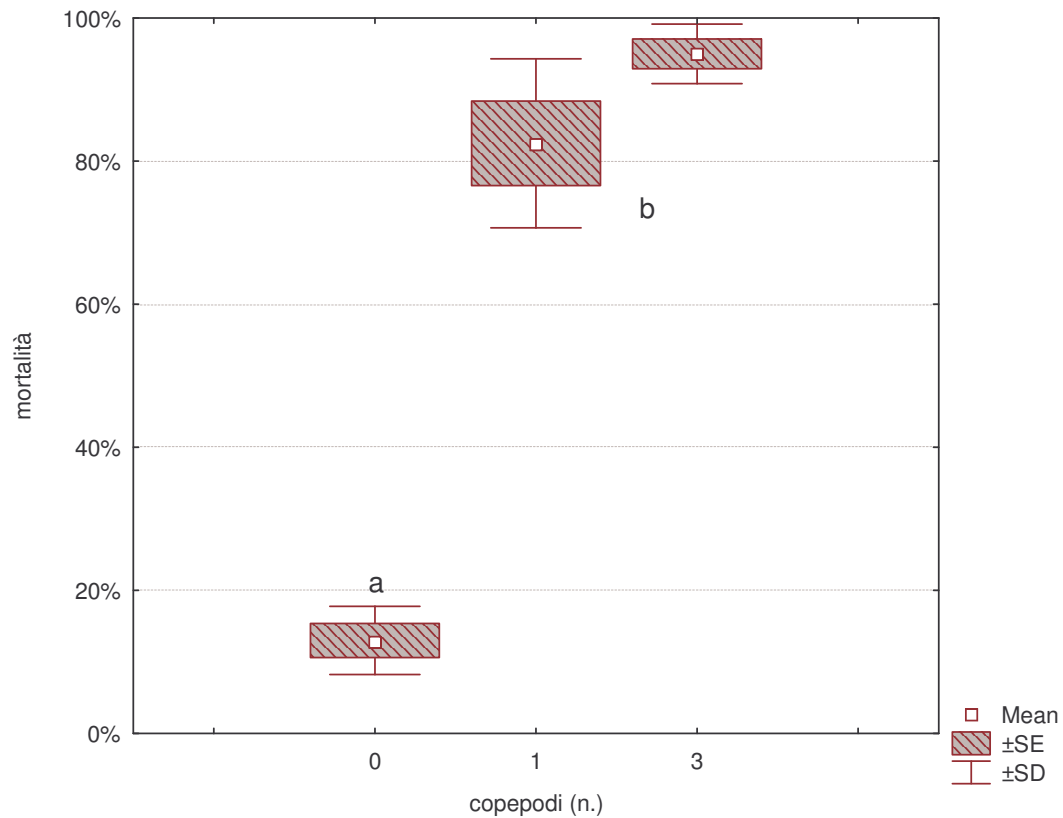
**Tab.5** Riepilogo dei risultati ottenuti nella prova di predazione in laboratorio sottoponendo a 1 (**C1**) e 3 (**C3**) esemplari di *Megacyclops viridis* 50 larve di 1<sup>a</sup> età di *Aedes albopictus*. Lettere (**a, b, c**) diverse indicano differenza significativa ( $p \leq 0,001$ ); **DS**= Deviazione Standard

Tesi	N	% di predazione a 24 ore		% di predazione da 24 a 48 ore		% predazione totale a 48 ore	
		Media $\pm$ DS	Corretta	Media $\pm$ DS	Corretta	Media $\pm$ DS	Corretta
			con Abbott		con Abbott		con Abbott
<b>C1</b>	4	82,50 $\pm$ 11,82 <b>a</b>	79,89	51,34 $\pm$ 36,58 <b>a</b>	34,29	88,50 $\pm$ 10,75 <b>a</b>	86,78
<b>C3</b>	4	95,00 $\pm$ 4,16 <b>a</b>	94,25	41,11 $\pm$ 8,39 <b>ab</b>	40,00	97,00 $\pm$ 2,58 <b>a</b>	96,55
<b>Mortalità Testimone</b>	4	13,00 $\pm$ 4,76 <b>b</b>		0,00 $\pm$ 0,00 <b>b</b>		13,00 $\pm$ 4,76 <b>b</b>	

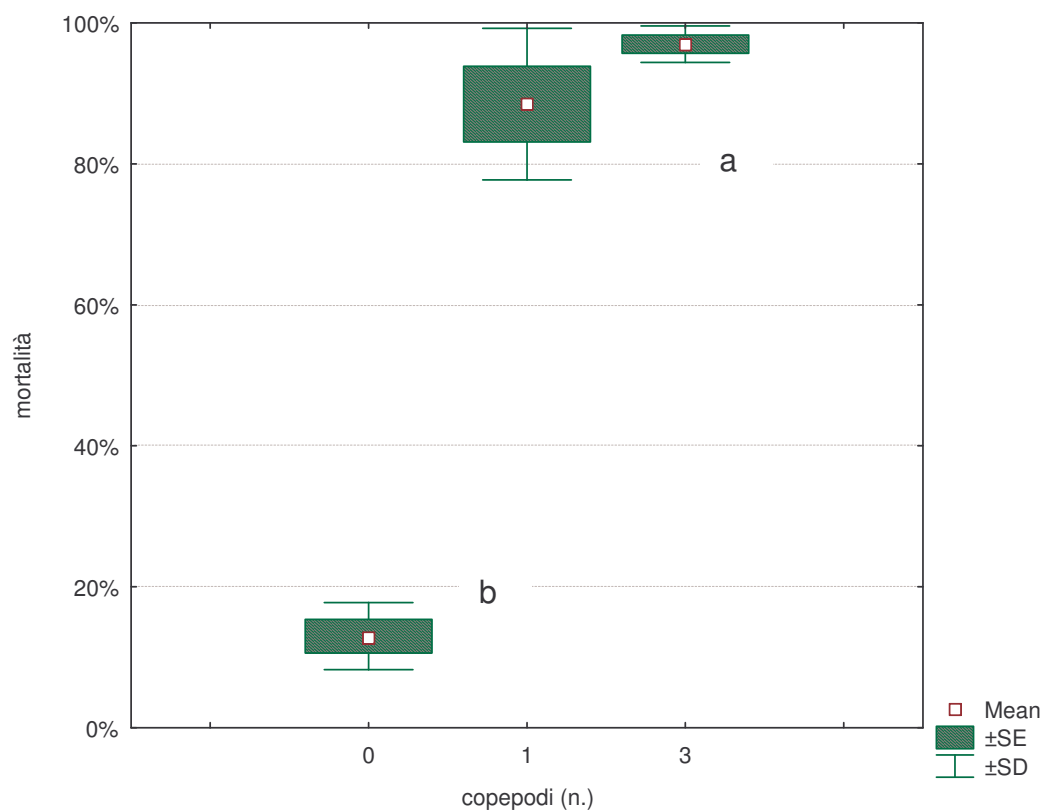
**Tab.6** Analisi della varianza (ANOVA) - mortalità alle diverse combinazioni di *M. viridis*

	Effect			Error			F	p
	SS	df	MS	SS	df	MS		
<b>Arcsen 24</b>	2,282227	2	1,141114	0,177148	9	0,019683	57,97423	0,000007
<b>Arcsen48</b>	2,627375	2	1,313687	0,194370	9	0,021597	60,82818	0,000006

**Fig.9** Predazione media ottenuta a 24 ore sottoponendo a 1 e 3 esemplari di **Megacyclops viridis** 50 larve di 1<sup>a</sup> età di **Aedes albopictus**. Lettere (**a** e **bc**) diverse indicano differenza significativa ( $p \leq 0,05$ )



**Fig.10** Predazione media ottenuta a 48 ore sottoponendo a 1 e 3 esemplari di **Megacyclops viridis** 50 larve di 1<sup>a</sup> età di **Aedes albopictus**. Lettere (**a** e **b**) diverse indicano differenza significativa ( $p \leq 0,05$ )



**Macrocyclus albidus**

Ogni singolo esemplare ha attaccato mortalmente a 24 ore e a 48 ore rispettivamente la media di 28,4 e 38 larve di *Ae. Albopictus*; similmente, nei confronti di *Cx. pipiens* la predazione ha portato alla morte mediamente 30 larve a 24 ore e circa 40 a 48 ore (Tab.7).

Per *Ae. albopictus*, Marten (1990) riporta un valore medio già a 24 ore di 45 di larve predate, ottenuto però in appena 10 ml di acqua e con copepodi a digiuno da 24 ore.

**Tab.7** Riepilogo dei risultati ottenuti nelle prove di predazione in laboratorio sottoponendo a 1 esemplare di *Macrocyclus albidus* 50 larve di 1<sup>a</sup> età di *Aedes albopictus* e di *Culex pipiens*. ( $\pm$ DS Deviazione Standard); \* numero delle repliche

% media di predazione ( $\pm$ DS)			
<i>Ae. albopictus</i> (25)*		<i>Cx. pipiens</i> (10)*	
a 24 ore	a 48 ore	a 24 ore	a 48 ore
57,60( $\pm$ 10,40)	76,80( $\pm$ 8,38)	59,80( $\pm$ 0,80)	79,20( $\pm$ 0,07)
Corretta con Abbott			
56,78	76,35	59,07	78,51
N. medio di larve morte nel TESTIMONE			
(10)*		(5)*	
1,9( $\pm$ 2,9)	3,3( $\pm$ 3,0)	2,0( $\pm$ 0,03)	3,2( $\pm$ 0,04)

Nella Tab.8 viene riassunto l'effetto predatorio delle quattro specie di ciclopoidi testate nei confronti di larve di 1<sup>a</sup> età di *Ae. albopictus*.

**Tab.8** Riepilogo della predazione (corretta con Abbott) su *Ae. albopictus* riscontrata nelle 4 prove eseguite in laboratorio (valori per singolo copepode)

	N. medio di larve predate a 24 ore	N. medio di larve predate a 40-48 ore
<i>Thermocyclops crassus</i>	20,9	44,3
<i>Acanthocyclops robustus</i>	18,2	20,8
<i>Megacyclops viridis</i>	40	43,4
<i>Macrocyclus albidus</i>	28,4	37,9



## Prestazioni predatorie in laboratorio a confronto

Nella combinazione “1 copepode + 50 larve di *Ae.albopictus*” a 24 ore le prestazioni osservate e sottoposte ad analisi statistica evidenziano differenze significative (Tab.9) tra le specie e permettono di stilare la seguente graduatoria in ordine decrescente di efficacia:

*Megacyclops viridis* > *Macrocyclus albidus* ≥ *Thermocyclops crassus* > *Acanthocyclops robustus*

Nella seconda parte della prova, da 24 a 48 ore, la capacità di predazione diventa:

*Thermocyclops crassus* > *Megacyclops viridis* > *Macrocyclus albidus* > *Acanthocyclops robustus*.

Infine a 48 ore il confronto consente la seguente combinazione:

*Thermocyclops crassus* ≥ *Megacyclops viridis* > *Macrocyclus albidus* > *Acanthocyclops robustus*.

*M. viridis* è risultato particolarmente efficiente nelle prime 24 ore, al contrario di *T. crassus* che è più efficiente nel secondo giorno. *M. albidus* ha invece mostrato un'attività costante, mentre *A. robustus* ha prestazioni assai inferiori rispetto alle altre tre specie (Tab.10; Figg.11 e 12).

**Tab.9** Analisi delle varianze (ANOVA a 1 via con trasformazione angolare dei dati)

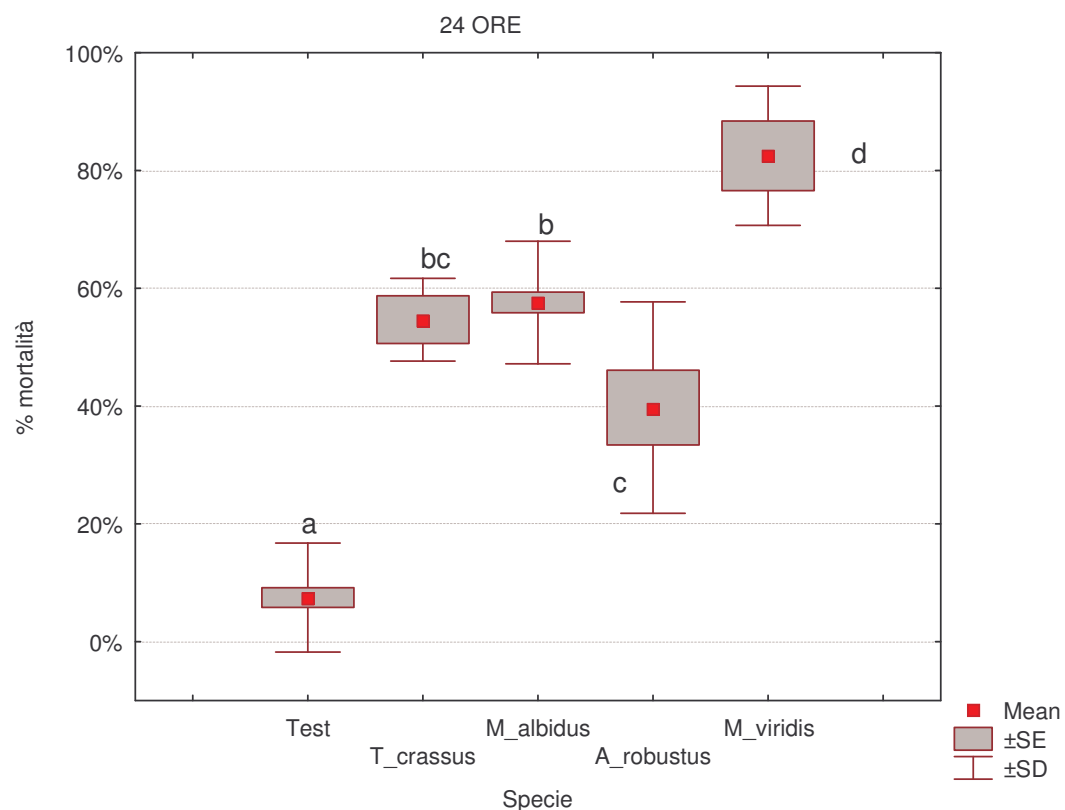
	Effect			Error			F	p
	SS	df	MS	SS	df	MS		
<b>Arcsen24</b>	8,61966	4	2,154916	1,890896	76	0,024880	86,6116	0,000000
<b>Arcsen24_48</b>	7,72409	4	1,931023	2,283803	76	0,030050	64,2602	0,000000
<b>arcsenTot48</b>	12,68822	4	3,172056	1,667715	76	0,021944	144,5548	0,000000

**Tab.10** Risultati ottenuti sottoponendo a 1 esemplare di ciclopoide 50 larve di 1<sup>a</sup> età di *Aedes albopictus*

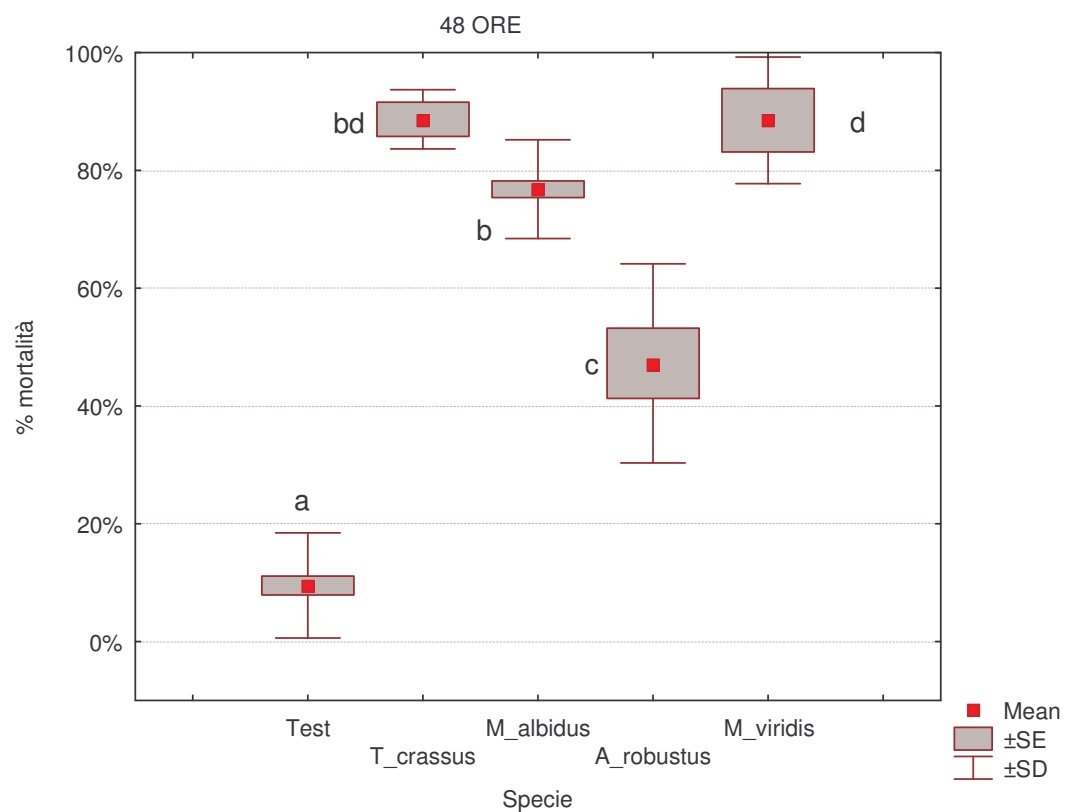
		Predazione								
	N	a 24 ore			da 24 a 48 ore			totale a 48 ore		
		Media	DS	Test Duncan*	Media	DS	Test Duncan*	Media	DS	Test Duncan*
Testimone	31	7,50%	9,25%	a	3,61%	4,93%	a	9,53%	8,92%	a
<i>T.crassus</i>	3	54,67%	7,02%	bc	74,03%	12,60%	b	88,67%	5,03%	bd
<i>M.albidus</i>	35	57,60%	10,40%	b	45,92%	13,14%	c	76,80%	8,38%	b
<i>A.robustus</i>	8	39,75%	17,93%	c	13,38%	11,34%	a	47,25%	16,90%	c
<i>M.viridis</i>	4	82,50%	11,82%	d	51,34%	36,58%	bc	88,50%	10,75%	d
All Grps	81	37,78%	27,40%		27,82%	25,43%		49,15%	34,19%	

\*Lettere (a, b, c, d) diverse indicano differenza significativa ( $p \leq 0,001$ ); **DS**= Deviazione Standard

**Fig.11** Predazione media a confronto a 24 ore ottenuta da un esemplare di ciascuna specie di ciclopoide testata in laboratorio verso 50 larve di 1<sup>a</sup> età di *Aedes albopictus*



**Fig.12** Predazione media a confronto a 48 ore ottenuta da un esemplare di ciascuna specie di ciclopoide testata in laboratorio verso 50 larve di 1<sup>a</sup> età di *Aedes albopictus*



Anche 3 esemplari insieme di ciascuna specie mostrano a 24 e 48 ore prestazioni in linea con quelle ottenute da un solo copepode. Il confronto fra le predazioni ottenute con 3 esemplari evidenzia percentuali molto elevate in *M.viridis* (95% a 24 ore e 97% a 48 ore) seguito da *T.crassus* (81,33% e 92,67%), mentre *A.robustus* ha confermato la scarsa efficacia (55,5% e 63,5%).

A 48 ore nessuna delle tre specie testate portano a morte tutte e 50 le larve di *Ae. albopictus* (Tabb.11 e 12; Figg.13 e 14).

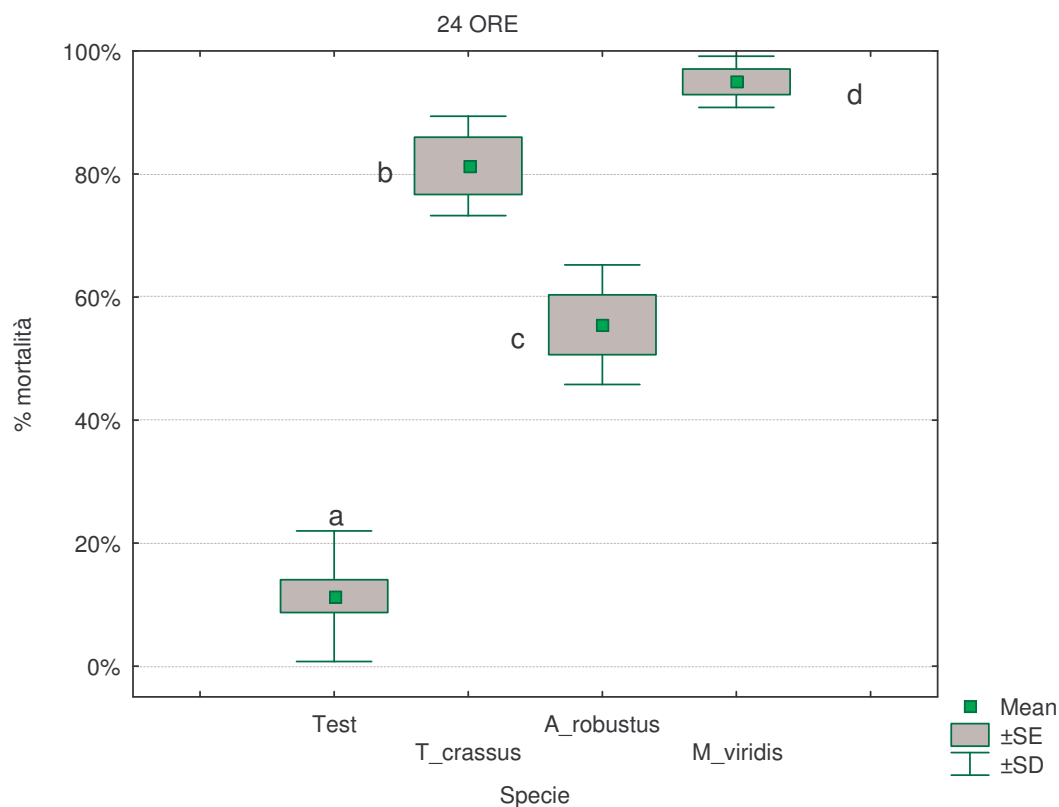
**Tab.11** Analisi delle varianza (ANOVA a 1 via con trasformazione angolare dei dati)

	Effect			Error			F	p
	SS	df	MS	SS	df	MS		
<b>Arcsen24</b>	4,953827	3	1,651276	0,675198	23	0,029356	56,24921	0,000000
<b>arcsen24_48</b>	2,098004	3	0,699335	0,692361	23	0,030103	23,23166	0,000000
<b>arcsen48</b>	5,443983	3	1,814661	0,479553	23	0,020850	87,03350	0,000000

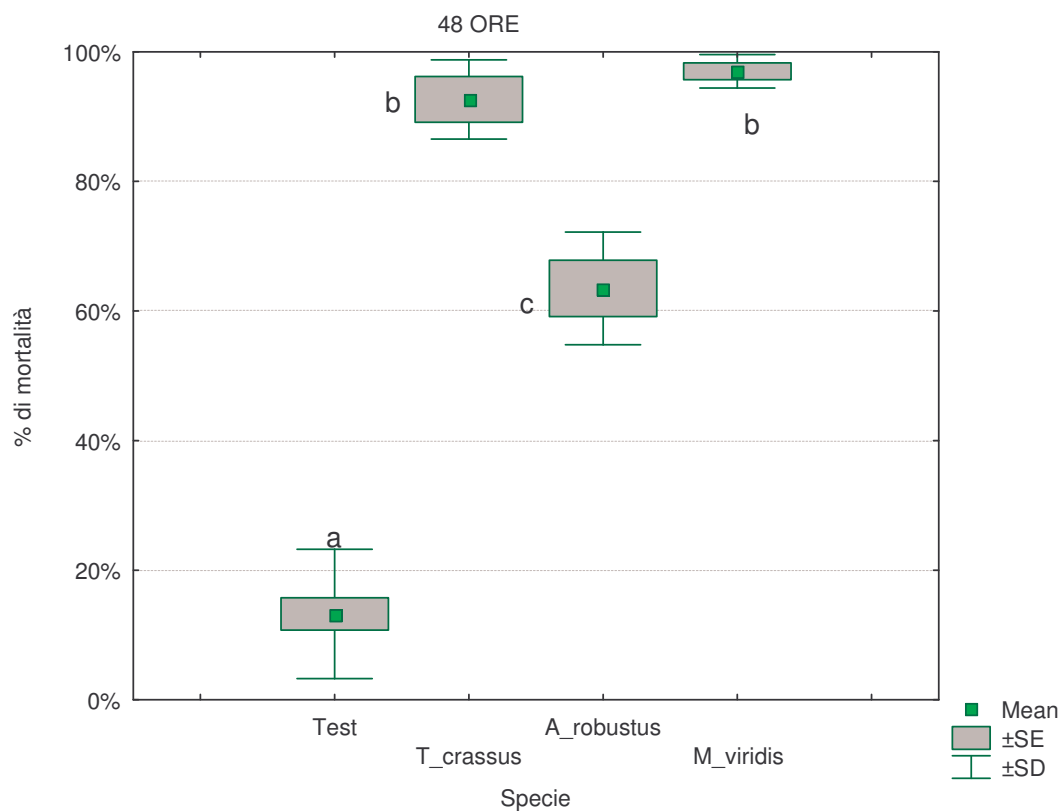
**Tab.12** Risultati ottenuti sottoponendo a 3 esemplari di ciclopoidi 50 larve di 1<sup>a</sup> età di *Aedes albopictus*.

Specie	N	% mortalità								
		a 24 ore			da 24 a 48 ore			totale a 48 ore		
		Media	DS	Test Duncan	Media	DS	Test Duncan	Media	DS	Test Duncan
<b>Testimone</b>	16	11,38%	10,63%	<b>A</b>	2,02%	2,30%	<b>a</b>	13,25%	9,99%	<b>A</b>
<b><i>T.crassus</i></b>	3	81,33%	8,08%	<b>b</b>	64,29%	18,90%	<b>b</b>	92,67%	6,11%	<b>B</b>
<b><i>A.robustus</i></b>	4	55,50%	9,71%	<b>c</b>	17,53%	11,67%	<b>c</b>	63,50%	8,70%	<b>C</b>
<b><i>M.viridis</i></b>	4	95,00%	4,16%	<b>d</b>	41,11%	8,39%	<b>c</b>	97,00%	2,58%	<b>B</b>
<b>All Grps</b>	27	38,07%	35,82%		16,10%	23,12%		41,92%	37,57%	

**Fig.13** Predazione media a confronto a 24 ore ottenuta da 3 esemplari di ciascuna specie di ciclopoide testata in laboratorio verso 50 larve di 1<sup>a</sup> età di *Aedes albopictus*



**Fig.14** Predazione media a confronto a 48 ore ottenuta da 3 esemplari di ciascuna specie di ciclopoide testata in laboratorio verso 50 larve di 1<sup>a</sup> età di *Aedes albopictus*



Considerando infine le due prove in cui *T. crassus* e *A. robustus* sono stati testati con 5 esemplari nei confronti di *Ae. albopictus* il test di Duncan conferma la maggior efficacia predatoria della prima specie rispetto alla seconda (Tabb.13 e 14; Figg.15 e 16).

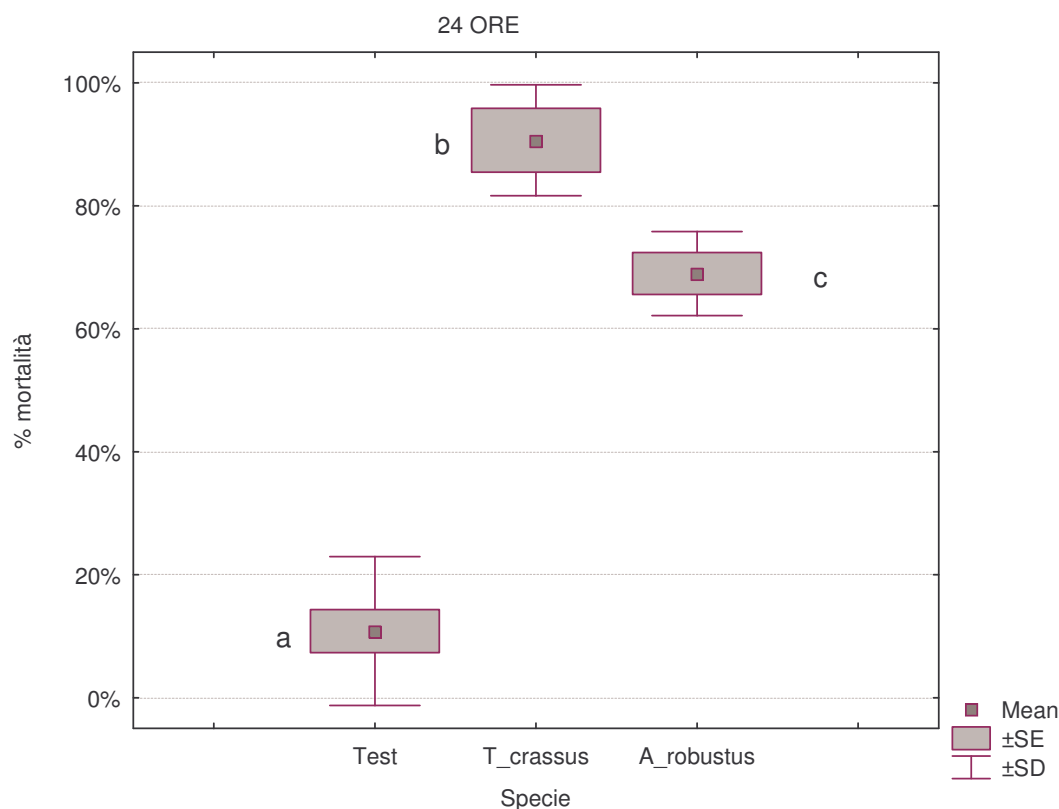
**Tab.13** Analisi delle varianza (ANOVA a 1 via con trasformazione angolare dei dati)

	Effect			Error			F	P
	SS	df	MS	SS	df	MS		
<b>Arcsen24</b>	3,411469	2	1,705735	0,648623	16	0,040539	42,07643	0,000000
<b>Arcsen24_48</b>	0,848546	2	0,424273	1,493733	16	0,093358	4,54457	0,027357
<b>Arcsen48</b>	3,620136	2	1,810068	0,464453	16	0,029028	62,35532	0,000000

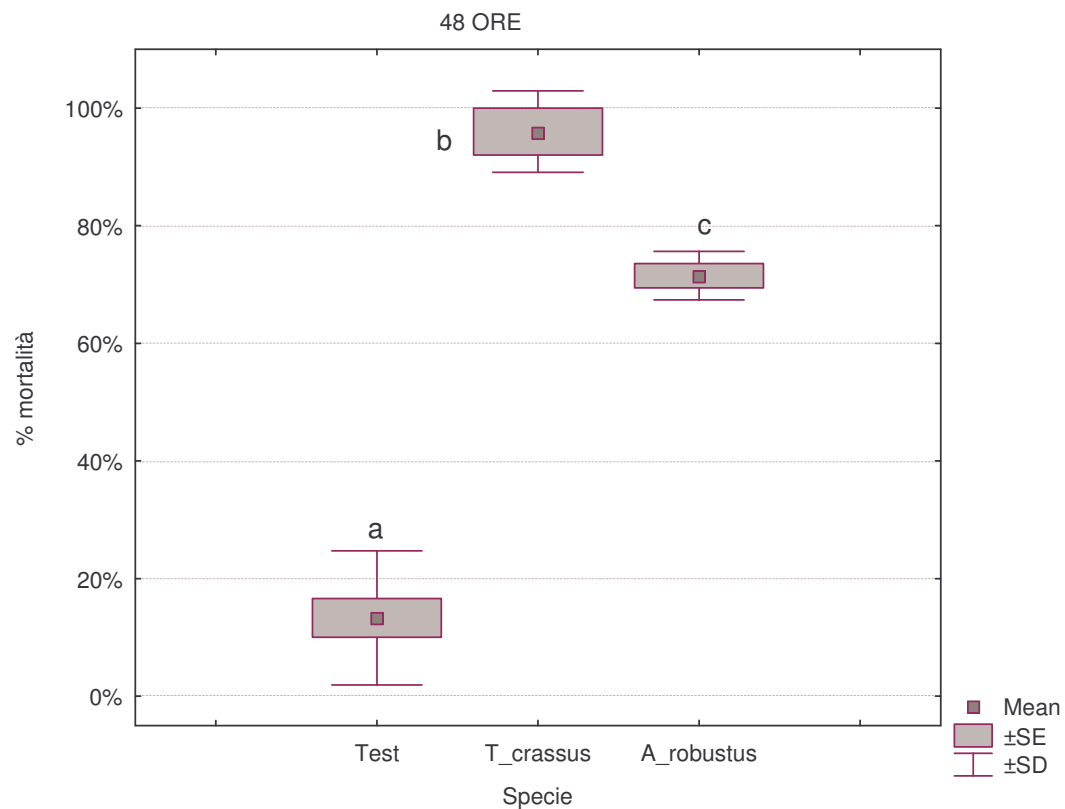
**Tab.14** Risultati ottenuti sottoponendo a 5 esemplari di ciclopoide 50 larve di 1<sup>a</sup> età di *Aedes albopictus*

Specie	N	% mortalità								
		a 24 ore			da 24 a 48 ore			totale a 48 ore		
		Media	DS	Test Duncan	Media	DS	Test Duncan	Media	DS	Test Duncan
Testimone	12	10,83%	12,10%	<b>a</b>	2,70%	2,28%	<b>a</b>	13,33%	11,39%	<b>A</b>
<i>T.crassus</i>	3	90,67%	9,02%	<b>b</b>	66,67%	47,14%	<b>b</b>	96,00%	6,93%	<b>B</b>
<i>A.robustus</i>	4	69,00%	6,83%	<b>c</b>	6,88%	8,00%	<b>a</b>	71,50%	4,12%	<b>C</b>
All Grps	19	35,68%	35,62%		10,73%	23,72%		38,63%	36,10%	

**Fig.15** Predazione media a confronto a 24 ore ottenuta da 5 esemplari di *Thermocyclops crassus* e di *Acanthocyclops robustus* testati in laboratorio verso 50 larve di 1<sup>a</sup> età di *Aedes albopictus*



**Fig.16** Predazione media a confronto a 48 ore ottenuta da 5 esemplari di *Thermocyclops crassus* e di *Acanthocyclops robustus* testati in laboratorio verso 50 larve di 1<sup>a</sup> età di *Aedes albopictus*



Con la sola esclusione della prova con *T. crassus*, in tutte le altre le migliori performances di predazione sono state osservate nelle prime 24 ore e ciò è probabilmente da attribuire al fatto che le larve di zanzara col passare del tempo aumentano di dimensioni.



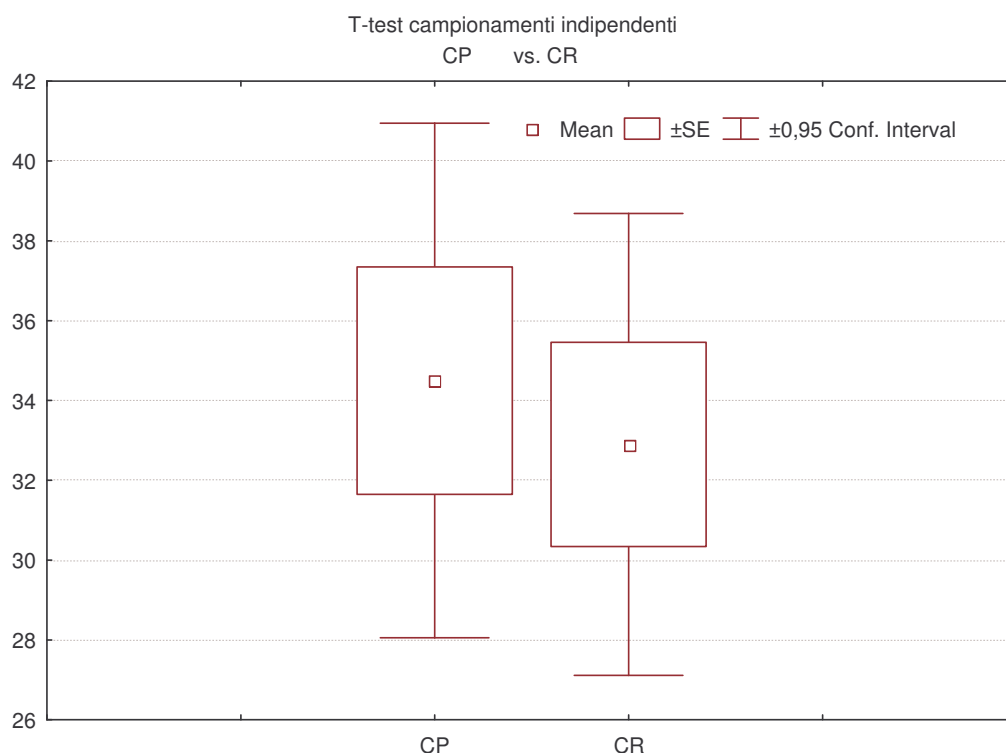
## TECNICA DI ALLEVAMENTO

### 1<sup>a</sup> prova di allevamento

All'osservazione microscopica periodica, nei barattoli alimentati con *Paramencium* spp. (**CP**) è sempre stata osservata una netta dominanza di tale ciliato e a densità inferiori anche qualche rotifero a conferma della difficoltà a mantenere pura la coltura; nei bicchieri senza inoculo di *Paramencium* spp. e a cui era stata aggiunta acqua proveniente da un acquario e cibo secco per gatti (**CR**) si rinveniva regolarmente una popolazione mista di varie specie di protozoi ciliati, *Tetrahymena pyriformis*, *Blepharisma lateritium*, *Paramecium putrinum* e di rotiferi del gen. *Thricocerca* spp.

Al conteggio finale, nei bicchieri **CP** sono stati rinvenuti mediamente 34,3 ( $\pm 9,53$ ) adulti di *M.albidus* rispetto a 32,9 ( $\pm 8,08$ ) esemplari ottenuti dai bicchieri **CR** (Fig.1. L'analisi statistica non ha evidenziato differenze significative tra i due sistemi di alimentazione (t-test  $t=0,42$  e  $P=0,68$ )

**Fig.1** Numero medio di esemplari ottenuti a 18 giorni da una femmina di *M.albidus* utilizzando come cibo *Paramecium* spp. (**CP**) e cibo secco per gatti + acqua di acquario (**CR**)



### 2<sup>a</sup> prova di allevamento

La concentrazione di ossigeno dell'acqua a 7 giorni è risultata di 7,7 mg/l nelle vaschette **L**, 8,3 mg/l in quelle **Cr** e 9,2 mg/l in **G**, aumentando a valori compresi tra 10,75 e 10,96 in tutte e tre le tesi al 20<sup>esimo</sup> giorno. In tutti i casi si tratta di valori compatibili con le esigenze di *M.albidus* (Tinson & Laybourn-Parry, 1985).

Nelle vaschette **G** già a 7 gg. la densità di ciliati era molto bassa con una netta prevalenza di rotiferi, mentre nelle tesi **L** e **Cr**, la popolazione era rappresentata sia da ciliati che da rotiferi, a maggiore densità nelle bacinelle **Cr**.

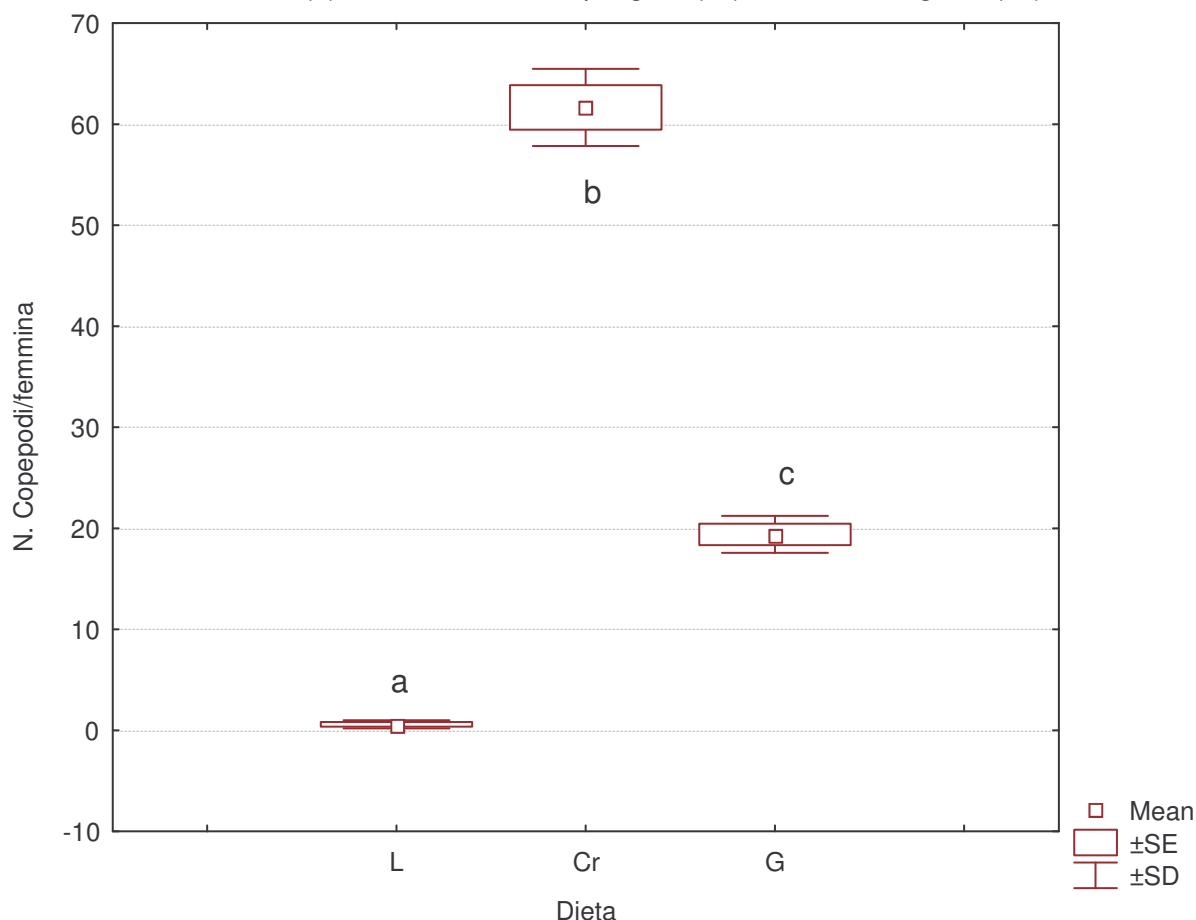
I risultati mettono in evidenza un'ottima produttività di copepodi e copepoditi nel sistema alimentato a cibo secco per gatti, significativamente superiore a quello con grano nel quale evidentemente occorre aggiungere periodicamente una certa quantità di coltura di microrganismi. Il latte, infine non ha consentito di mantenere lo sviluppo delle colonie inoculate con la conseguente morte per mancanza di cibo di quasi tutti i copepodi adulti e della loro prole ( $F_{2,6} = 486,56$  e  $p < 0,0001$ ).

E' noto che allo stadio di nauplio l'alimentazione è a carico di ciliati di piccole dimensioni, mentre i copepoditi e gli adulti si nutrono di specie di più grande dimensioni come *Paramecium* e rotiferi. Ciò probabilmente spiega il basso risultato in termini di individui ottenuti mediamente nelle bacinelle con grano e latte rispetto a quelle con cibo secco per gatti (Tab.1; Fig.2).

**Tab.1** Numero medio di individui (copepodi adulti e copepoditi) ( $\pm$  Dev. St.) a 20 giorni ottenuti da 5 femmine di *Macrocyclus albidus*, in presenza di ciliati e rotiferi con cariossidi di grano (Gr), cibo secco triturato per gatti (Cr) e latte (L)

Tipo di dieta	N	N. Copepodi ( $\pm$ DS)/vasca	N. Copepodi/femmina
Gr	3	97 ( $\pm$ 9,17)	19,4 ( $\pm$ 1,83) <b>a</b>
Cr	3	308,33 ( $\pm$ 19,09)	61,7( $\pm$ 3,82) <b>b</b>
L	3	2 ( $\pm$ 3)	0,6( $\pm$ 0,40) <b>c</b>

**Fig.2** Numero medio di individui a 20 giorni ottenuti da 1 femmina di *Macrocyclus albidus*, in presenza di ciliati e rotiferi con latte (L), cibo secco triturato per gatti (Cr) e cariossidi di grano (Gr)



Analizzando il numero di individui ottenuti nella 1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> prova con la dieta a base di cibo secco per gatti (**CR**) si mettono in evidenza differenze significative ( $F_{1,11} = 33,99$  e  $p < 0,001$ ) e ciò può trovare spiegazione nel probabile effetto sulle densità finali dovuto al cannibalismo, più intenso nei piccoli contenitori della 1<sup>a</sup> prova rispetto alle vaschette impiegate nella 2<sup>a</sup> prova.

### **3<sup>a</sup> prova di allevamento**

Al 18<sup>esimo</sup> giorno la media di esemplari di *M.albidus* ottenuti da una sola femmina alimentata con la dieta **CR** è stata di 29,90 ( $\pm 4,38$ ), un valore in linea con quello ottenuto nella 1<sup>a</sup> prova.

## PROVE DI EFFICACIA DI *MACROCYCLOPS ALBIDUS* IN CONDIZIONI DI SEMICAMPO E DI CAMPO

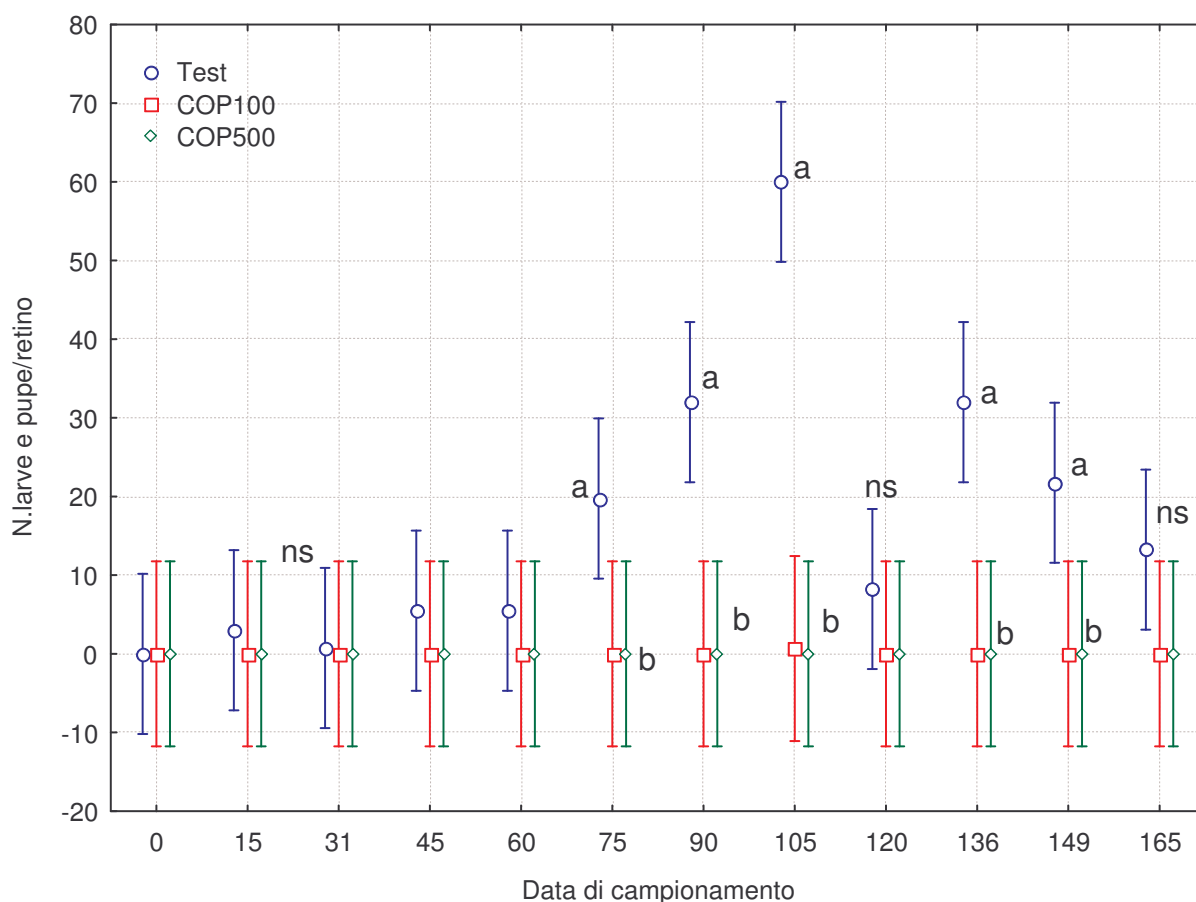
### Prova di efficacia in semicampo in bidoni da 220 l di capacità (risultati 2007)

La temperatura media minima dell'acqua è stata di 17,5°C, quella massima di 23°C nei bidoni collocati nella zona ombreggiata sotto gli alberi (24 aprile-21 ottobre). Nei tre bidoni collocati al sole la temperatura media minima dell'acqua è stata di 16,8°C e quella massima di 29,9°C (24 giugno-21 ottobre).

Le uniche specie di zanzare rinvenute col campionamento sono state *Ae. albopictus* e *Cx. pipiens*. La presenza di larve di zanzara di entrambe le specie è stata osservata per la prima volta nel campionamento del 25 maggio nei bidoni testimone.

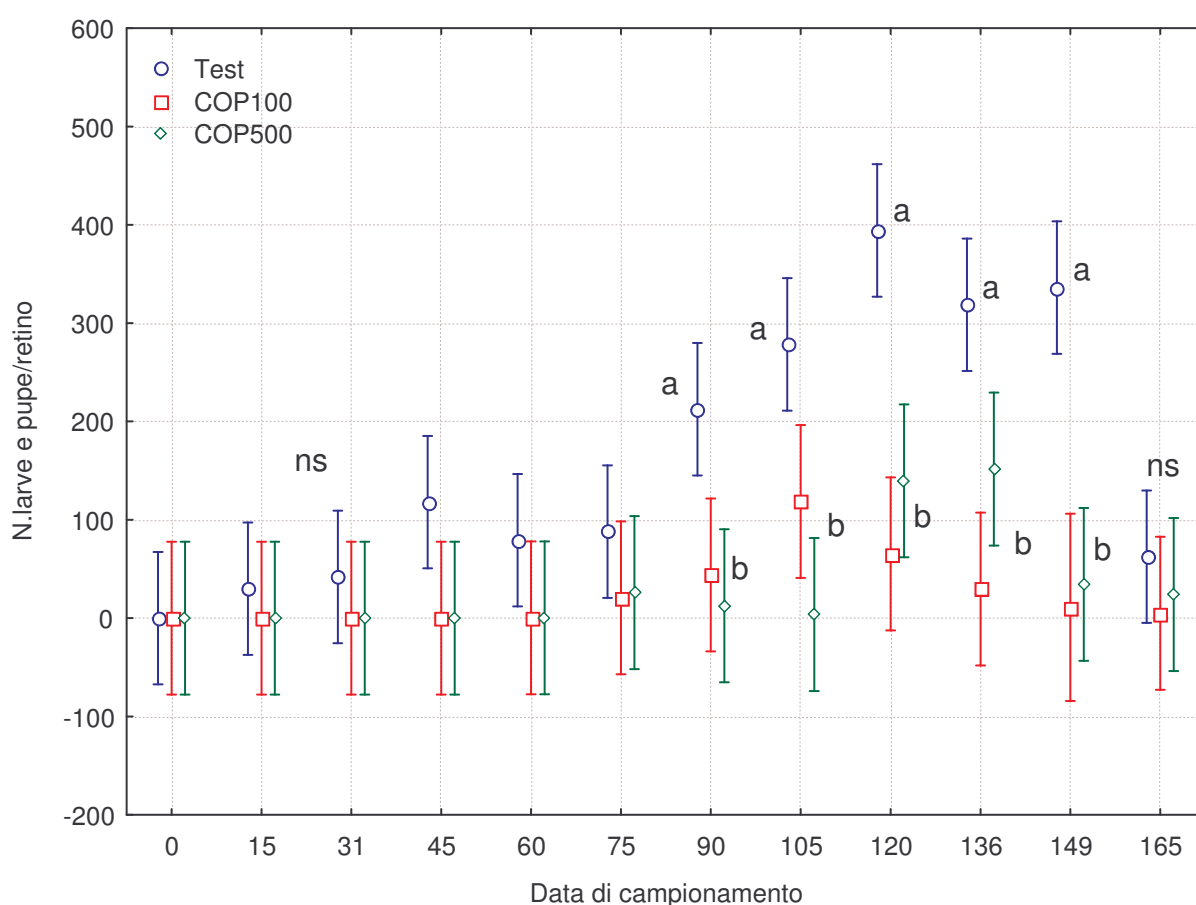
A parte un caso di un bidone con 2 larve (23 agosto) non sono mai state campionate larve e/o pupe di *Ae. albopictus* nei bidoni con i copepodi alle due dosi di inoculo iniziali. L'ANOVA a blocchi evidenzia una differenza significativa tra le densità di larve e pupe campionate di tale specie ( $F=10,92$  e  $P<0,001$ ) tra testimone e bidoni con copepodi tra il 24 luglio e il 7 ottobre, mentre tra le due dosi di copepodi non si osservano mai differenze significative (Fig.1).

**Fig. 1** Densità media  $\pm$ ES di larve (3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> età) e pupe di *Aedes albopictus* registrata nei bidoni testimone (Test; N=4) e nei bidoni con *Macrocyclus albidus* con dosi iniziali di immissione (25 aprile 2007) di 100 (COP100; N=3) e 500 (COP500; N=3) esemplari/bidone



Nei bidoni con copepodi l'infestazione larvale di *Cx. pipiens* si registra la prima volta nel campionamento del 9 luglio, data dalla quale in tutti i bidoni sono facilmente visibili ovature galleggianti in numero anche superiore alla decina. L'analisi statistica evidenzia differenze significative tra le 3 tesi ( $F=16,18$  e  $P<0,001$ ) nella densità di larve e pupe di *Cx. pipiens*, in particolare le differenze sono tra i bidoni testimone e quelli con copepodi tra l'8 agosto e il 7 ottobre. Tra le due densità di immissione di Copepodi invece non si osservano mai differenze significative (Fig.2).

**Fig.2** Densità media  $\pm$ ES di larve (3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> età) e pupe di *Culex pipiens* registrata nei bidoni testimone (Test; N=4) e nei bidoni con *Macrocyclus albidus* con dosi iniziali di immissione (25 aprile 2007) di 100 (COP100; N=3) e 500 (COP500; N=3) esemplari/bidone



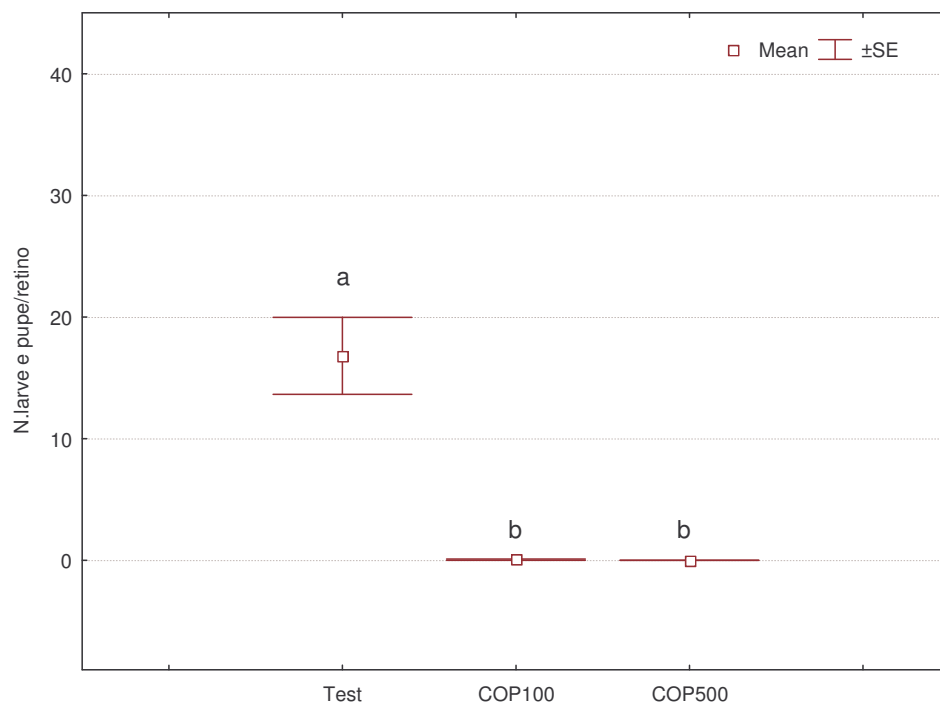
Il numero medio di larve e pupe campionate nelle tre tesi è riepilogato in Tab.1.

**Tab.1** Riepilogo delle densità medie  $\pm$  DS nel periodo 10 maggio-22 ottobre 2007 di larve e pupe registrata nei bidoni testimone (Test) e nei bidoni con *Macrocyclus albidus* con dosi iniziali di immissione (25 aprile 2007) di 100 (COP100; N=3) e 500 (COP500; N=3) esemplari, (\*N =numero dei campioni; \*\*DS= deviazione Standard)

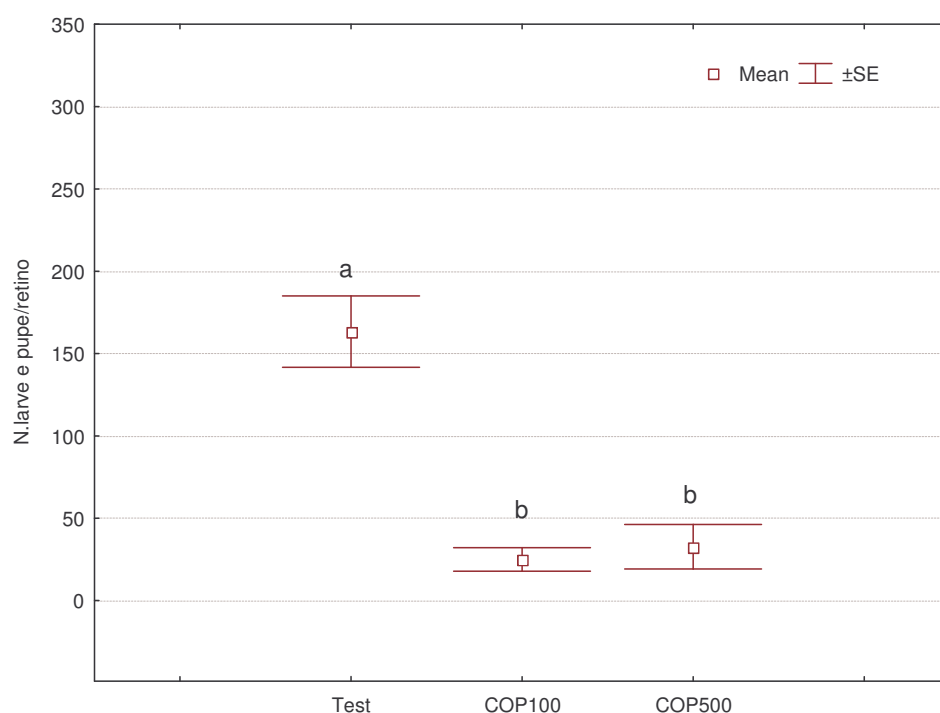
tesi	<i>Ae.albopictus</i> (n.)			<i>Cx.pipiens</i> (n.)			Copepodi (n.)		
	N*	Media	DS**	N	Media	DS	N	Media	DS
Test	48	16,81	21,89	48	163,33	150,07	48	0,00	0,00
COP100	36	0,05	0,33	35	24,94	42,12	36	94,72	79,36
COP500	36	0,00	0,00	36	32,69	81,14	36	83,47	92,31

Nella densità media stagionale di larve e pupe si osservano differenze significative tra il testimone e entrambe le dosi di copepodi sia per *Ae. albopictus* ( $F=21,05$  e  $p<0,001$ ) che per *Cx. pipiens* ( $F=22,30$  e  $p<0,001$ ). Non si osservano invece differenze nella densità di larve di zanzara e di copepodi tra le due tesi di copepodi. (Fig.3 e Fig.4).

**Fig.3** Densità media stagionale  $\pm$  Errore Standard ( $\pm$ SE) di *Aedes albopictus* nei bidoni testimone (Test) e nei bidoni con *Macrocyclops albidus* con dosi iniziali di immissione (25 aprile 2007) di 100 (COP100) e 500 (COP500) esemplari. Lettere **a** e **b** diverse significa differenza significativa ( $p<0,001$ )



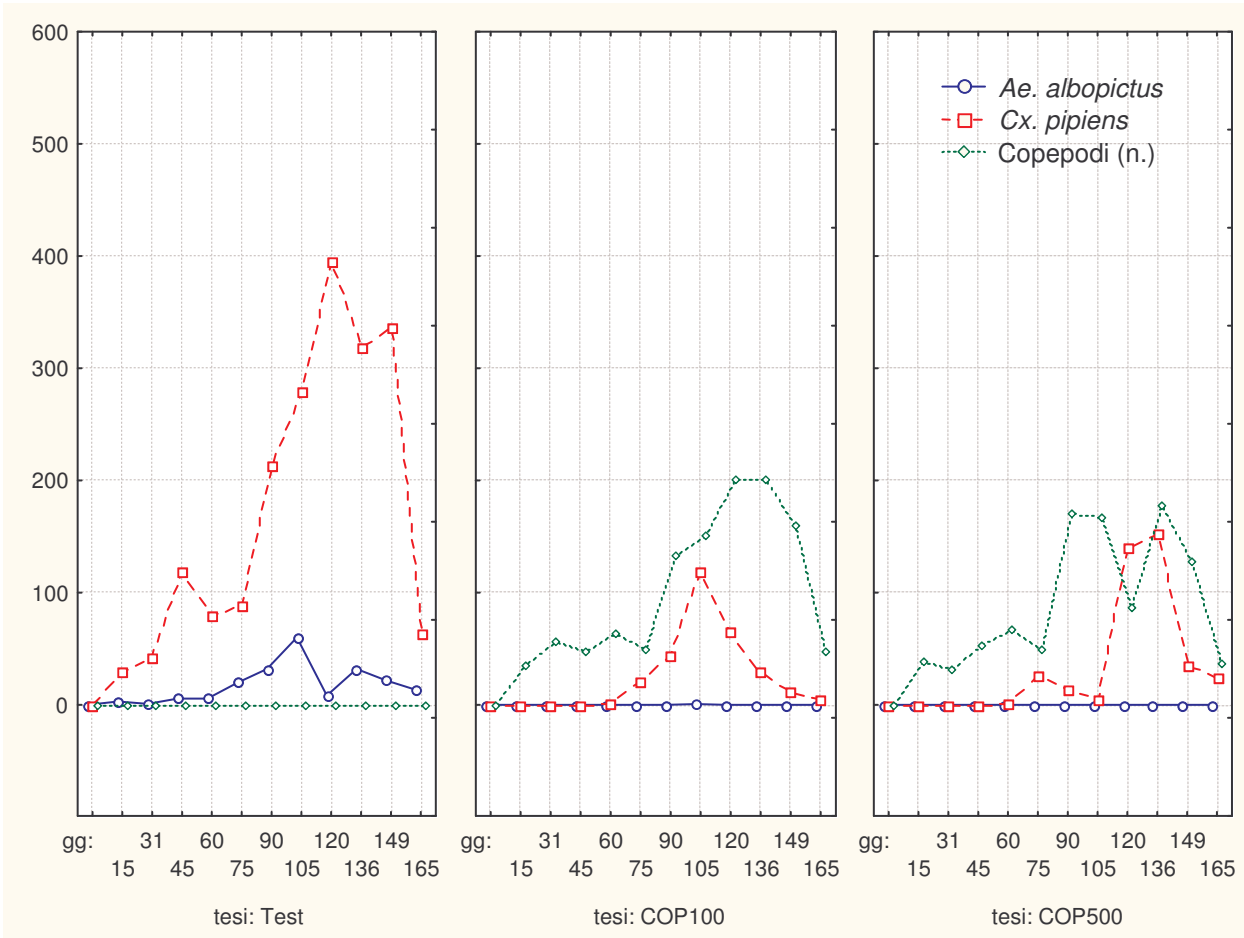
**Fig.4** Densità media stagionale  $\pm$  Errore Standard ( $\pm$ SE) di *Culex pipiens* nei bidoni testimone (Test) e nei bidoni con *Macrocyclops albidus* con dosi iniziali di immissione (25 aprile 2007) di 100 (COP100) e 500 (COP500) esemplari. Lettere **a** e **b** diverse significa differenza significativa ( $p<0,001$ )



La Fig.5 rappresenta graficamente l'andamento delle infestazioni di larve e pupe e della densità di copepodi nelle tre tesi.

Il tasso di riduzione medio delle infestazioni di *Ae. albopictus* nei bidoni con copepodi, rispetto al testimone, è del 99,90% ( $\pm 0,34\%$ ) e del 100,0% ( $\pm 0,0\%$ ) rispettivamente in COP100 e COP500; per *Cx. pipiens* tale percentuale media è risultata di 88,69% ( $\pm 13,51\%$ ) e di 84,65% ( $\pm 18,48\%$ ) (Tab.2). Dall'analisi statistica non si osservano differenze significative tra la media stagionale della percentuale di riduzione tra le due dosi di copepodi.

**Fig.5** Andamento della densità di larve e pupe di zanzara e di copepodi (numero medio/retino in ordinata) nei bidoni testimone (Test) e nei bidoni alle dosi iniziali di 100 (COP100) e 500 (COP500) esemplari di *Macrocyclus albidus*. (Giorno "0" in ascissa = 10 maggio 2007)



**Tab.2** Percentuale di riduzione della popolazione di larve e pupe di Culicidi rispetto al testimone, nei bidoni con Copepodi alle dosi iniziali di 100 (COP100) e 500 (COP500) esemplari di *Macrocyclus albidus*, dal 10 maggio al 22 ottobre 2007

Tesi	N	<i>Ae.albopictus</i>		<i>Cx.pipiens</i>		Totale	
		Media	DS	Media	DS	Media	DS
<b>COP100</b>	11	99,90	0,34	88,69	13,51	90,26	11,31
<b>COP500</b>	11	100,00	0,00	84,65	18,48	86,36	16,54
<b>All Grps</b>	22	99,95	0,24	86,67	15,93	88,31	13,97

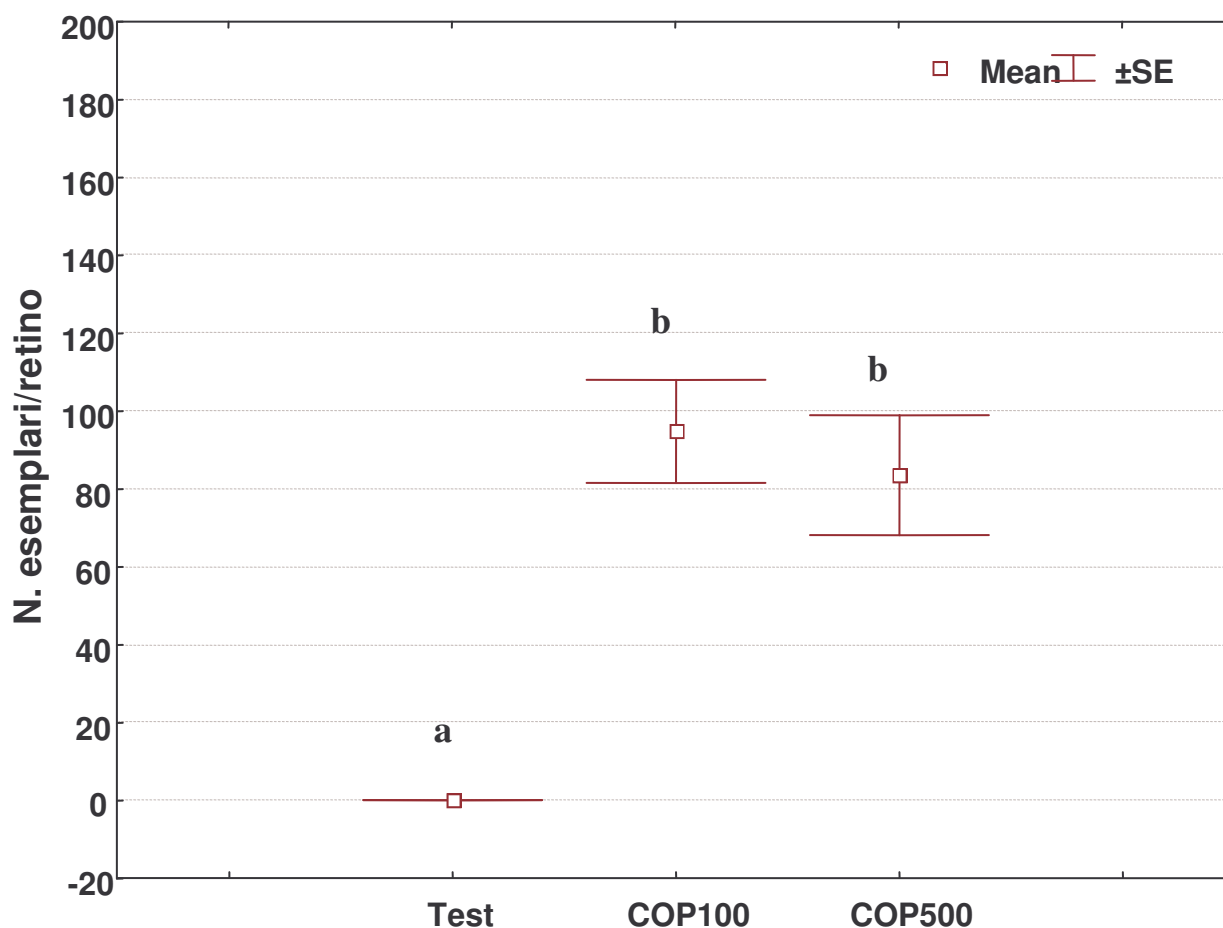
Riguardo alla dinamica di sviluppo di *M.albidus* si è osservata una colonizzazione stabile e un suo incremento numerico che raggiunge la densità massima nei mesi di agosto e settembre (Tab.1; Fig.5 e



Fig.6). La densità media stagionale risulta superiore nei bidoni con la dose di immissione iniziale inferiore (100 esemplari/didone) anche se tale differenza non è significativa. Risulta invece significativa la densità di copepodi tra i bidoni con copepodi ed il testimone ( $F=26,04$  e  $p<0,001$ ), dove non sono mai stati campionati copepodi.

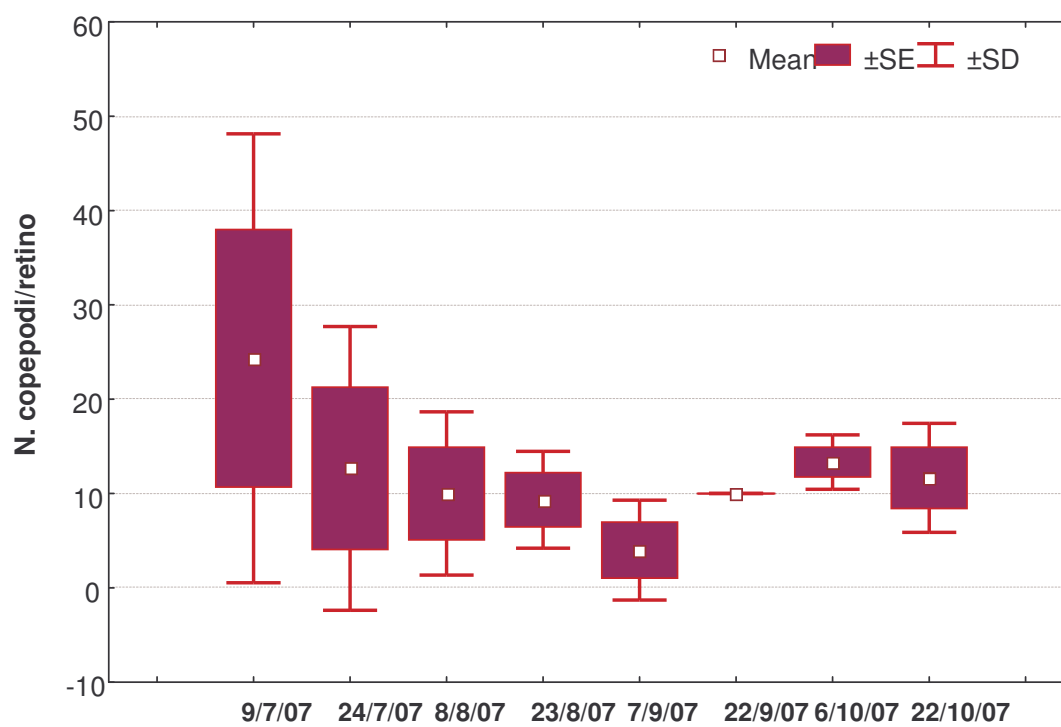
**Fig.6** Densità media stagionale  $\pm$  Errore Standard ( $\pm$ SE) di *Macrocyclus albidus* nei bidoni testimone (Test) e nei bidoni con *Macrocyclus albidus* con dosi iniziali di immissione di 100 (COP100) e 500 (COP500) esemplari.

Lettere **a** e **b** diverse significa differenza significativa ( $p<0,001$ )



Nei bidoni al sole durante tutto il periodo di campionamento (9luglio-22 ottobre) sono sempre stati rinvenuti dei ciclopoidi con densità media di  $11,9 \pm 10,28$  esemplari/bidone (Fig.7).

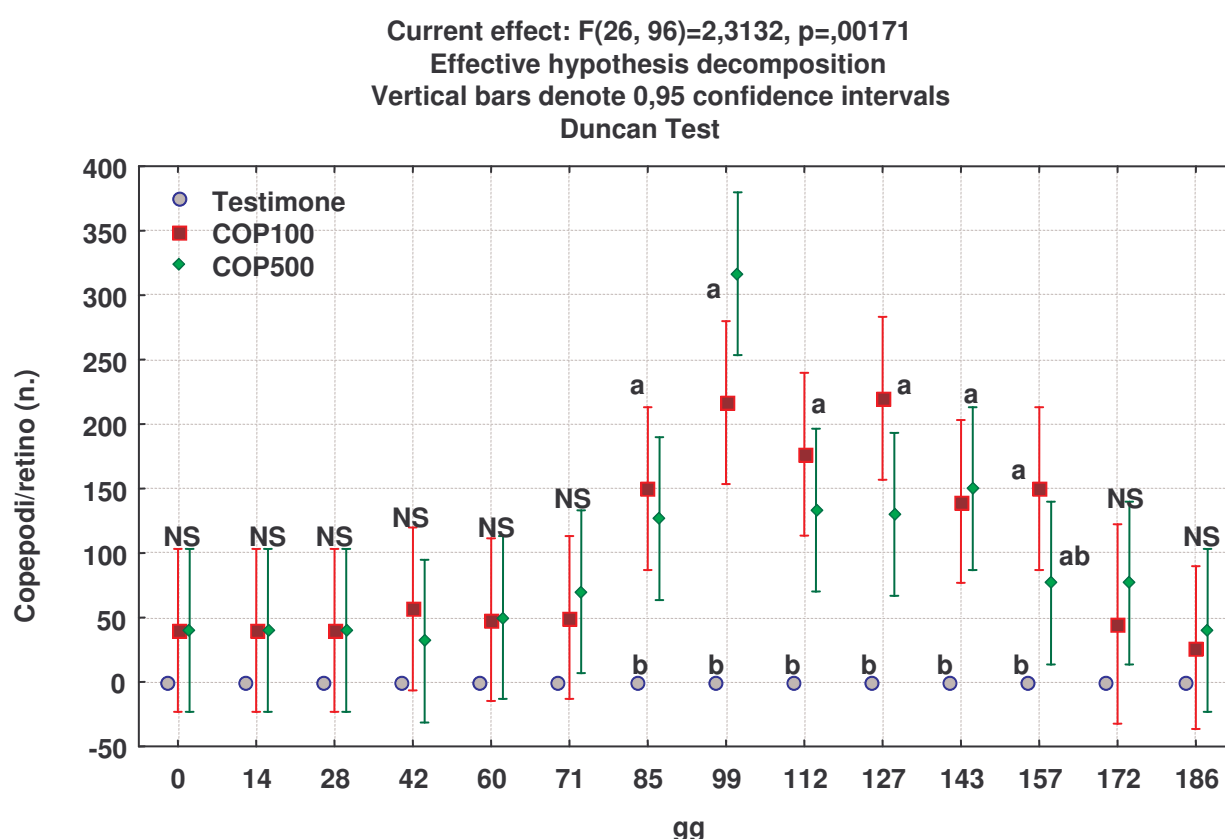
**Fig.7** Densità media di *Macrocyclus albidus* nei bidoni al sole durante i campionamenti del 2007



## Prova di efficacia in semicampo in bidoni da 220 l di capacità (risultati 2008)

A distanza esatta di un anno dall'introduzione dei copepodi il numero medio di esemplari campionati nei bidoni sottoposti in origine (25/4/07) alle due diverse dosi di inoculo è risultato statisticamente uguale (Fig.1).

**Fig.1** Densità media di *Macrocyclus albidus* registrata nei bidoni inoculati con dosi iniziali di immissione (25 aprile 2007) di 100 (COP100) e 500 (COP500) esemplari/bidone. In ordinata i giorni dal primo campionamento (25/7/08) fino all'ultimo (22/10/08)



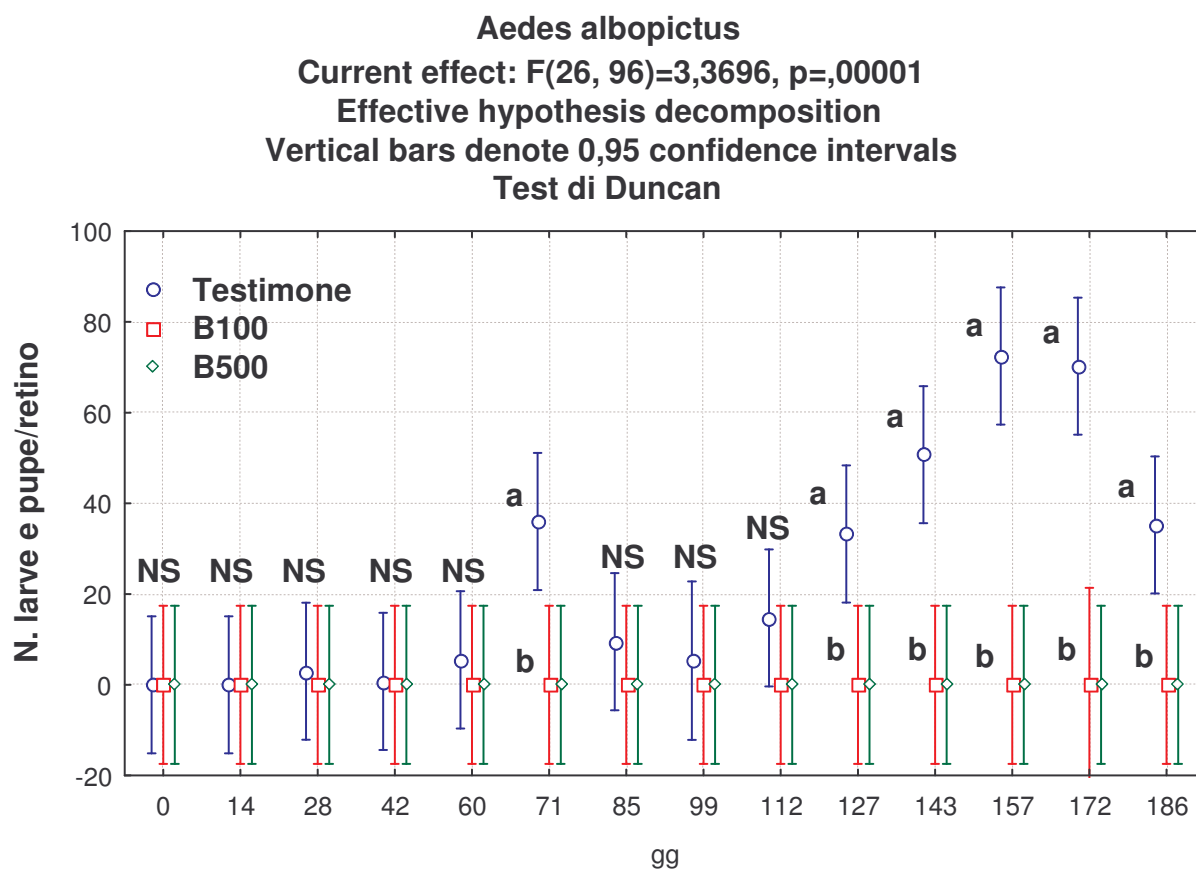
Le specie di zanzare rinvenute sono state *Ae. albopictus* e *Cx. pipiens* e negli ultimi due campionamenti (14 e 28 ottobre) anche *Culiseta annulata* (Schrank).

La presenza di larve di zanzara di *Ae. albopictus* e *Cx. pipiens* è stata osservata per la prima volta nel campionamento del 23 maggio nei bidoni testimone.

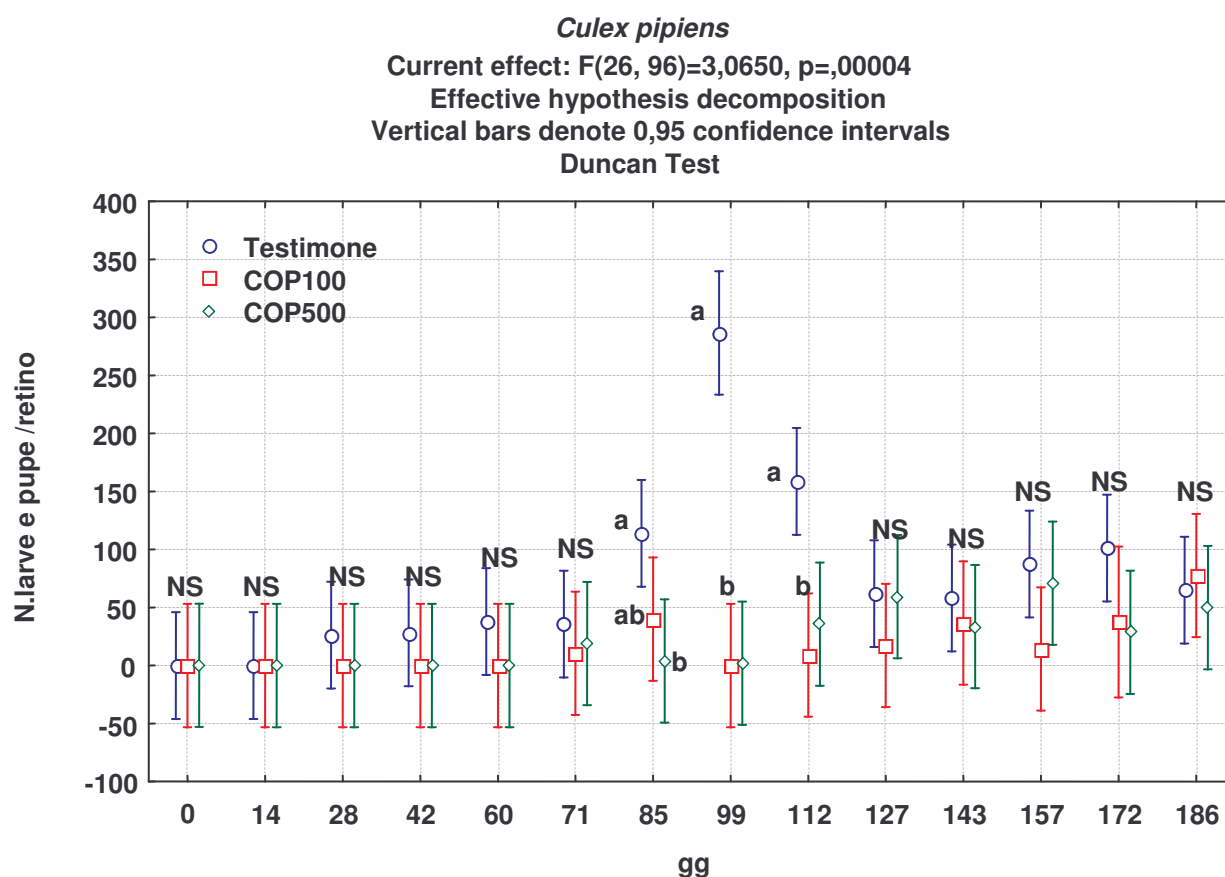
L'ANOVA a blocchi evidenzia una differenza significativa tra le densità di larve e pupe campionate di *Ae. albopictus* ( $F=12,04$  e  $P<0,005$ ) tra testimone e bidoni con copepodi (Fig.2) e una riduzione del 100% rispetto al testimone non essendo mai state campionate larve e/o pupe di tale specie nei bidoni con i copepodi.

Nei bidoni testimone l'infestazione larvale di *Cx. pipiens* si registra la prima volta il 23 maggio mentre in quelli con copepodi al campionamento del 5 luglio, data dalla quale in tutti i bidoni sono visibili ovature galleggianti in numero anche superiore alla decina (Fig.3). La riduzione media osservata di tale specie nei bidoni coi ciclopoidi rispetto al testimone è del 73,3%.

**Fig. 2** Densità media  $\pm$ ES di larve (3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> età) e pupe di *Aedes albopictus* registrata nel periodo 25 aprile-28 ottobre 2008 nei bidoni testimone (Test; N=4) e nei bidoni con *Macrocyclus albidus* inoculati il 25 aprile 2007 con 100 (COP100; N=3) e 500 (COP500; N=3) esemplari/bidone



**Fig. 3** Densità media  $\pm$ ES di larve (3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> età) e pupe di *Culex pipiens* registrata nel periodo 25 aprile-28 ottobre 2008 nei bidoni testimone (Test; N=4) e nei bidoni con *Macrocyclus albidus* inoculati il 25 aprile 2007 con 100 (COP100; N=3) e 500 (COP500; N=3) esemplari/bidone



Il numero medio di larve e pupe campionate nelle due tesi è riepilogato in Tab.1.

**Tab.1** Riepilogo delle densità medie  $\pm$  DS nel periodo 25 aprile-28 ottobre 2008 di larve di 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> età e pupe registrata nei bidoni testimone (**Test**) e nei bidoni con *Macrocyclus albidus* (**COP**) inoculati il 25 aprile 2007

(\*N =numero dei campioni; \*\*DS= deviazione Standard)

tesi	<i>Ae.albopictus</i> (n.)			N	<i>Cx.pipiens</i> (n.)		N	Copepodi (n.)	
	N*	Media	DS**		Media	DS		Media	DS
<b>Test</b>	55	<b>24,40</b>	32,39	48	<b>72,00</b>	84,22	48	<b>0,00</b>	0,00
<b>COP</b>	84	<b>0,00</b>	0,00	35	<b>19,36</b>	37,49	36	<b>91,48</b>	96,73

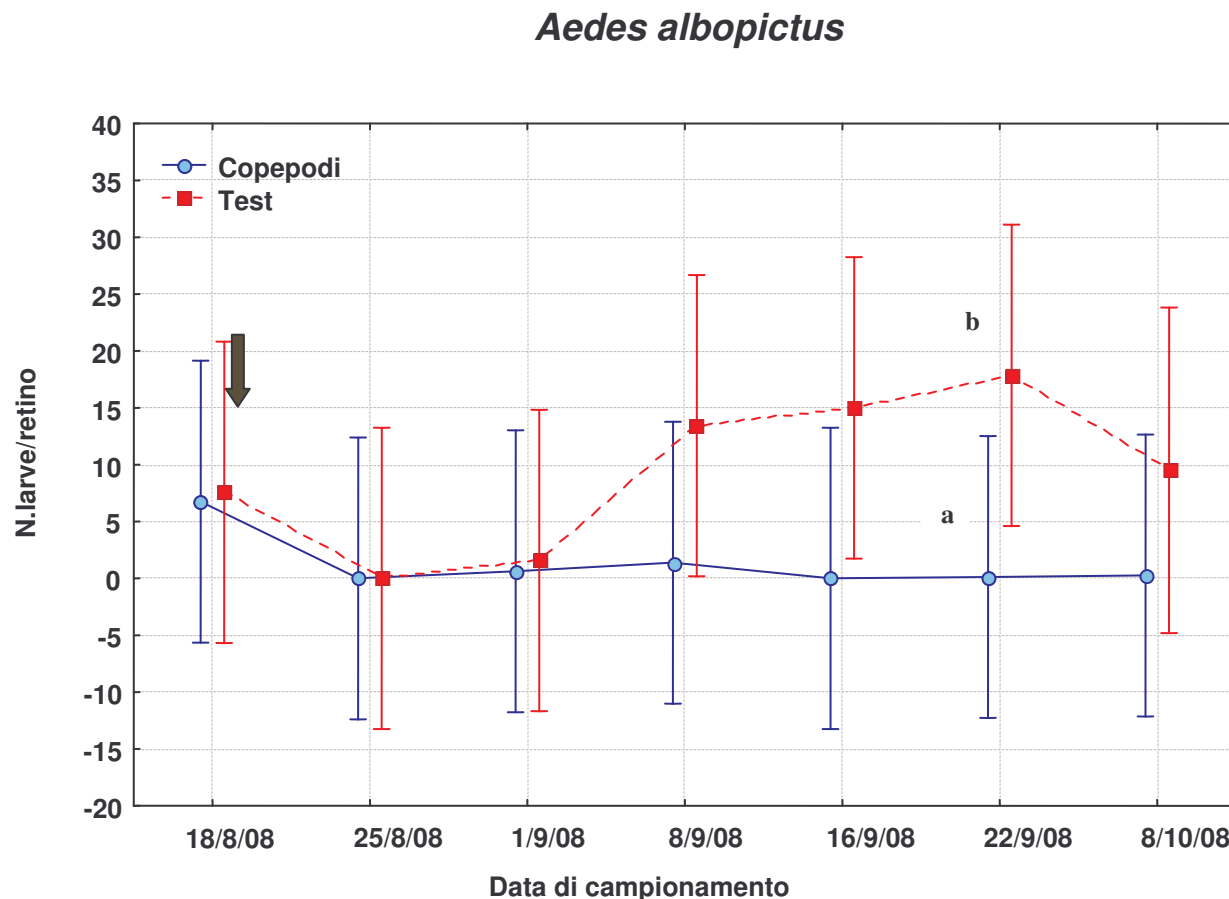
Riguardo alla dinamica di sviluppo di *M.albidus* si è osservata un incremento delle densità tra l'ultima decade di luglio e la fine di settembre con un andamento simile nei bidoni con dosi iniziali di immissione 2007 diverse. La densità media stagionale è risulta di 91,48 esemplari/retino in linea con le densità medie osservate nei campionamenti del 2007.

## Prova di efficacia in campo in serbatoi per l'acqua irrigua degli orti

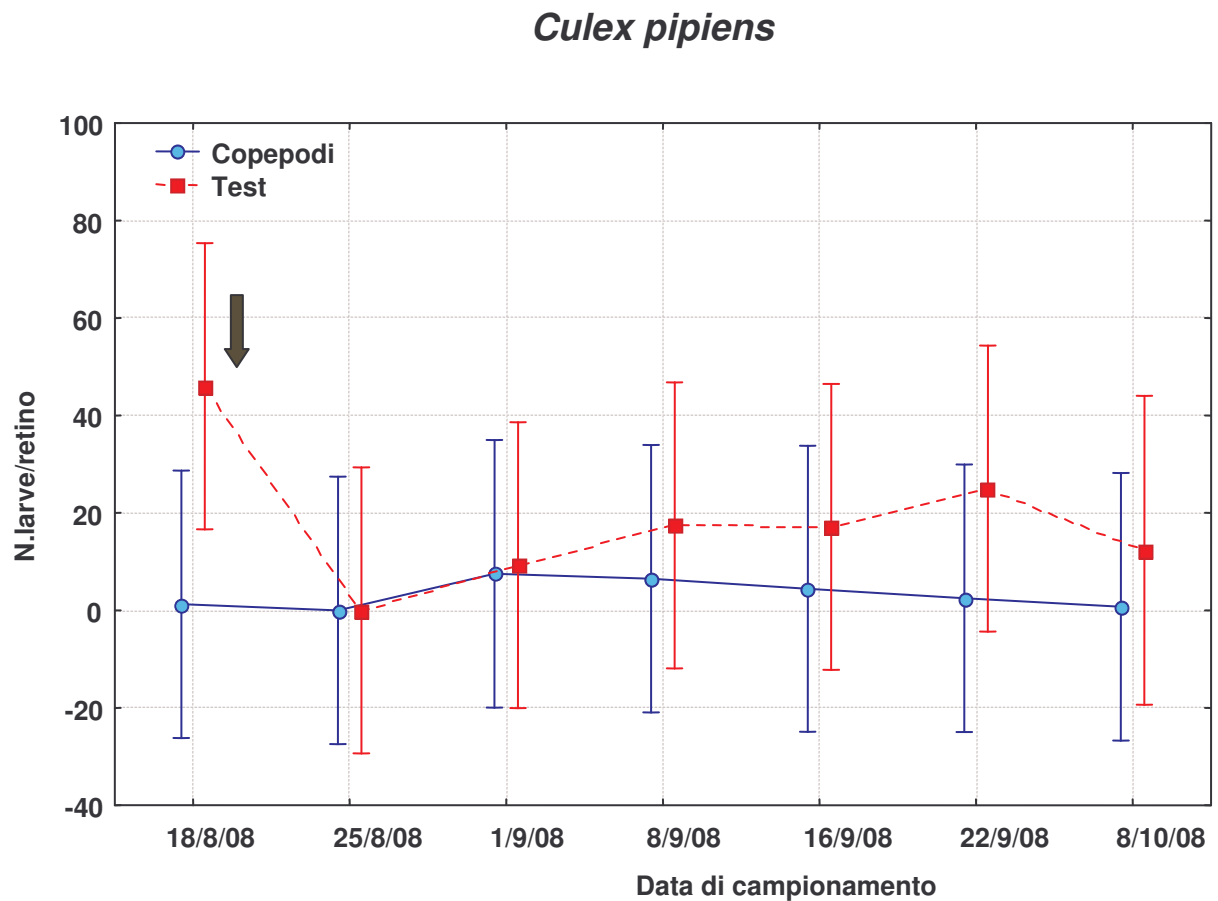
Dopo l'introduzione in tutti i serbatoi sono stati ritrovati esemplari di copepodi, nonostante il volume di acqua misurato settimanalmente sia variato da pochi litri in qualche bidone fino a valori della massima capacità, per effetto del prelievo e dell'apporto dell'acqua da parte dei gestori degli orti.

Le specie di zanzare rinvenute sono state *Ae. albopictus*, *Cx. pipiens* e come specie occasionale in qualche bidone, *Anopheles maculipennis* s.l. Meigen. La densità larvale osservata in pre-trattamento, crolla nella prima settimana per effetto del trattamento con *B.t.i.* e riprende soltanto alla seconda e alla terza settimana post-trattamento rispettivamente per *Cx. pipiens* e per *Ae. albopictus* (Fig.1 e Fig.2). Dalla terza settimana post-trattamento si osservano differenze che risultano significative dal punto di vista statistico solo al 22 settembre per *Ae.albopictus*. La diversa conformazione dei bidoni e la quantità di acqua presente possono avere influenzato la persistenza di azione di *B.t.i.* e quindi avere inciso sulla variabilità dei dati. le popolazioni preimmaginali di entrambe le specie di zanzara nei serbatoi col copepode si mantengono a densità sempre inferiori rispetto ai serbatoi testimone. In termini percentuali la riduzione media di larve di 3<sup>a</sup>-4<sup>a</sup> età e pupe rispetto al testimone è del 95,86% per *Ae. albopictus* e del 73,30% per *Cx. pipiens*. La densità media di larve di 3<sup>a</sup>-4<sup>a</sup> età e pupe relativa alle due specie culicidiche dalla seconda settimana post-trattamento è riepilogata in Tab.1.

**FIG.1** Densità media di larve di 3<sup>a</sup>-4<sup>a</sup> età e di pupe di *Aedes albopictus* registrata nei serbatoi testimone (**Test**) e nei bidoni con *Macrocyclus albidus* (**Copepodi**). La freccia nera indica il momento dell'inoculo e il trattamento larvicida con *B.t.i.*



**Fig.2** Densità media di larve di 3<sup>a</sup>-4<sup>a</sup> età e di pupe di *Culex pipiens* registrata nei serbatoi testimone (**Test**) e nei bidoni con *Macrocyclus albidus* (**Copepodi**). La freccia nera indica il momento dell'inoculo e il trattamento larvicida con *B.t.i.*



**Tab.1** Riepilogo delle densità medie  $\pm$  DS di larve di 3<sup>a</sup>-4<sup>a</sup> età e di pupe registrata nei serbatoi testimone (**Test**) e in quelli con *Macrocyclus albidus* (**COP**) dopo l'introduzione dei copepodi

tesi	<i>Ae.albopictus</i> (n.)		<i>Cx.pipiens</i> (n.)	
	Media	DS	Media	DS
COP	0,40	1,06	3,61	9,34
Test	9,56	22,08	13,53	32,26



## Prove di efficacia in campo in tombini stradali

### 1<sup>a</sup> prova 2007

Dopo l'introduzione di *M. albidus* mediamente soltanto nel 77% dei tombini i copepodi sono sopravvissuti con densità, rilevate ai campionamenti, caratterizzate da una forte variabilità (Tab1).

**Tab.1** Percentuale di tombini con *Macrocyclus albidus* e densità del copepode osservate ad ogni campionamento dopo l'introduzione (9/7/07, giorno "0") fino al 20/10/07 (giorno "103"). DS = Deviazione Standard

GG. dall'introduzione	N	% media di tombini colonizzati $\pm$ DS	N. medio copepodi/2 dipper $\pm$ DS
0	10	100,00 $\pm$ 0,00%	-
14	10	80,00 $\pm$ 42,16%	6,10 $\pm$ 6,12
28	10	80,00 $\pm$ 42,16%	2,20 $\pm$ 2,20
49	10	80,00 $\pm$ 42,16%	4,30 $\pm$ 5,40
70	10	70,00 $\pm$ 48,30%	4,10 $\pm$ 6,08
84	10	70,00 $\pm$ 48,30%	9,90 $\pm$ 16,72
103	10	60,00 $\pm$ 51,64%	2,80 $\pm$ 3,22

Nel periodo di prova le precipitazioni sono state scarse (64 mm in totale) con soltanto un episodio (31 agosto) di una certa entità (22 mm). Le cause della rarefazione dei copepodi fino alla loro scomparsa in parte dei tombini è pertanto da ricercare non nell'eventuale dilavamento da parte della pioggia, quanto dalle caratteristiche chimico-fisiche dell'acqua. Tra queste innanzitutto la concentrazione di ossigeno che è sempre stata molto bassa ( $0 \div 1,03$  mg/l) per tutta la durata del periodo di studio. Inoltre, a questo fattore probabilmente è da aggiungere l'accumulo, a concentrazioni tossiche per *M. albidus*, di composti organici e chimici dalla degradazione e fermentazione dell'abbondante materiale vegetale (soprattutto foglie) in condizioni di ipossia o anossia.

Nei tombini dove *M. albidus* si è stabilito, la densità media campionata decresce fino alla prima settimana di agosto e torna a salire fino a tutto settembre per poi decrescere ancora bruscamente fino al 20 ottobre. Tutto ciò in linea con l'andamento delle temperature che nei periodi in cui sono più alte contribuiscono a peggiorare la qualità dell'acqua specie in assenza di piogge e, quando basse rallentano l'attività riproduttiva di *M. albidus*.

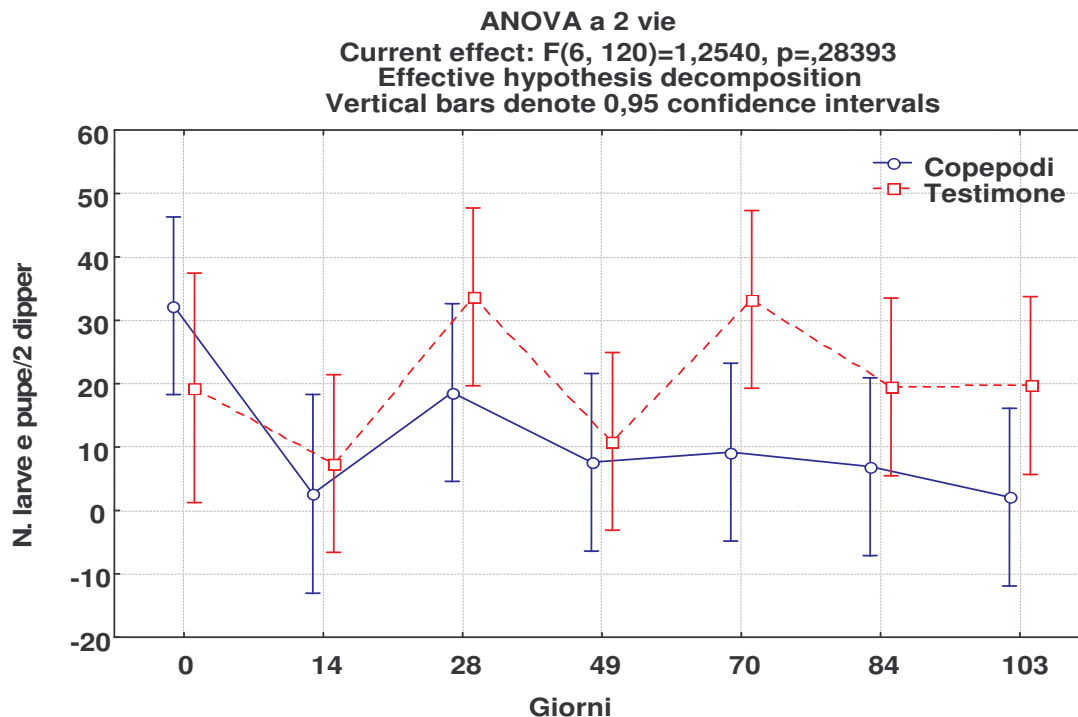
Le uniche due specie culicidiche campionate sono state *Culex pipiens* e *Aedes albopictus*.

Considerando soltanto le larve di 3<sup>a</sup>-4<sup>a</sup> età e le pupe campionate in tutti i tombini nell'arco della prova, *Cx. pipiens* ha rappresentato il 91,1%; *Ae. albopictus* l'8,9%.

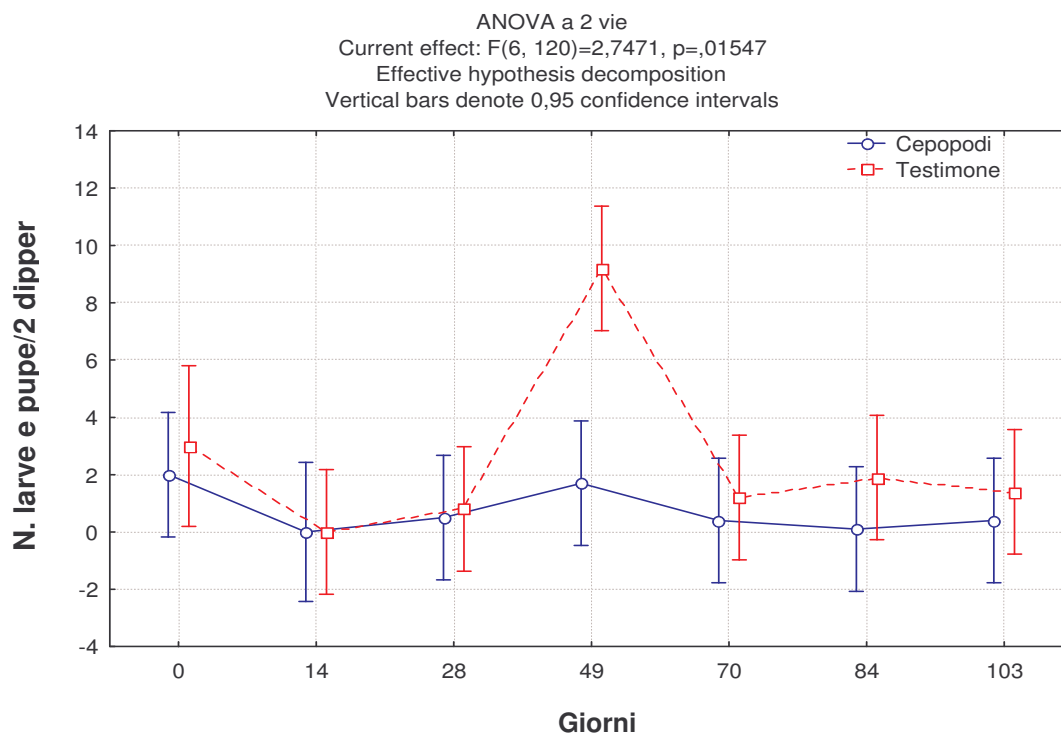
Le Figg.1 e 2 riportano graficamente l'andamento della popolazione preimmaginale campionata (3<sup>a</sup>-4<sup>a</sup> età e pupe) riferita a *Cx. pipiens* e a *Ae. albopictus* nel gruppo di tombini testimone e in quello trattato dove la colonizzazione da parte dei copepodi è risultata permanente. Ad ogni campionamento l'analisi statistica evidenzia l'assenza di differenze significative per entrambe le specie. Tuttavia *Ae. albopictus* nei tombini con i copepodi è mediamente inferiore del 97,6% rispetto al testimone, mentre tale valore per *Cx. pipiens* è del 74,3%.

La densità media di larve e pupe relativa alle due specie Culicidiche nel periodo post immissione dei copepodi è riepilogata in Tab.2.

**Fig.1** Dinamica della popolazione preimmaginale (larve di 3<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup> età + pupe) di *Culex pipiens* nei tombini testimone e in quelli con *Macrocyclus albidus* ad ogni campionamento dopo la sua introduzione (9/7/07, giorno “0”) fino al 20/10/07 (giorno “103”)



**Fig.2** Dinamica della popolazione preimmaginale (larve di 3<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup> età + pupe) di *Aedes albopictus* nei tombini testimone e in quelli con *Macrocyclus albidus* ad ogni campionamento dopo la sua introduzione (9/7/07, giorno “0”) fino al 20/10/07 (giorno “103”)



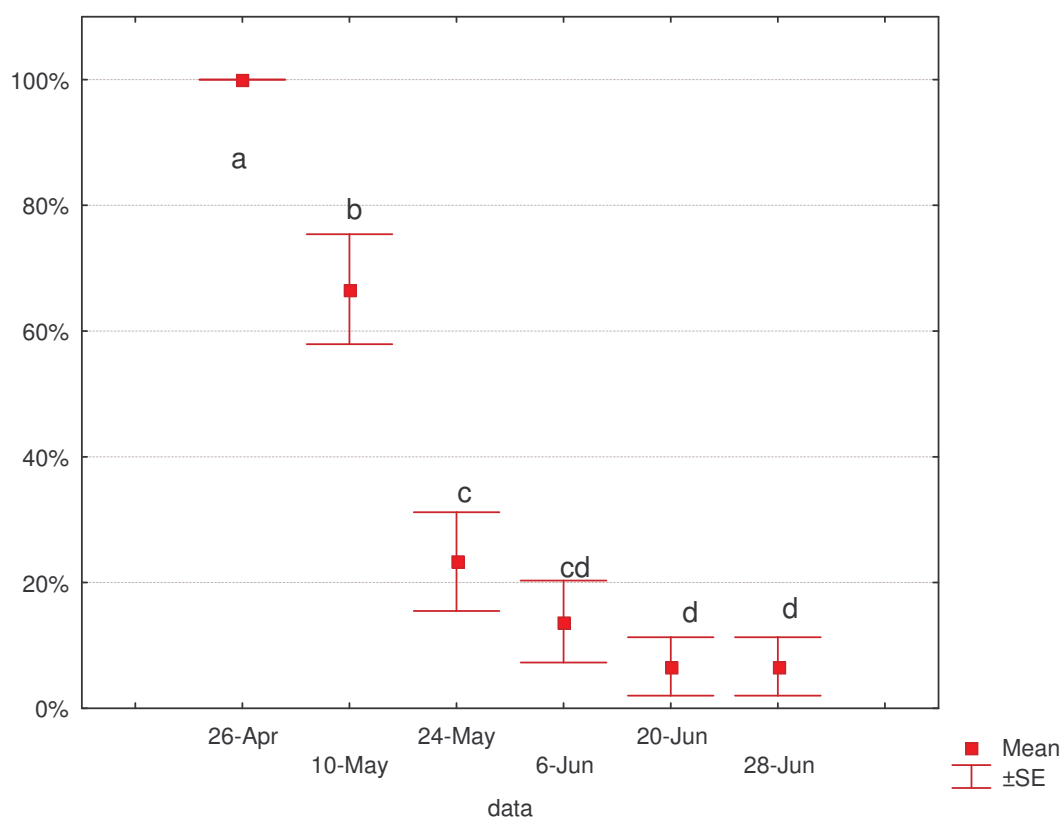
**Tab.2** Riepilogo delle densità medie  $\pm$  DS di larve e pupe registrata nei tombini testimone (Test) e nei tombini con *Macrocyclus albidus* (COP)  
(\*N =numero dei campioni; \*\*DS= Deviazione Standard)

tesi	<i>Ae.albopictus</i> (n.)			<i>Cx.pipiens</i> (n.)		
	N*	Media	DS**	N*	Media	DS**
<b>COP</b>	35	0,03	0,23	35	2,8	4,71
<b>Test</b>	57	1,27	3,90	57	10,9	21,96

## 2<sup>a</sup> prova 2008

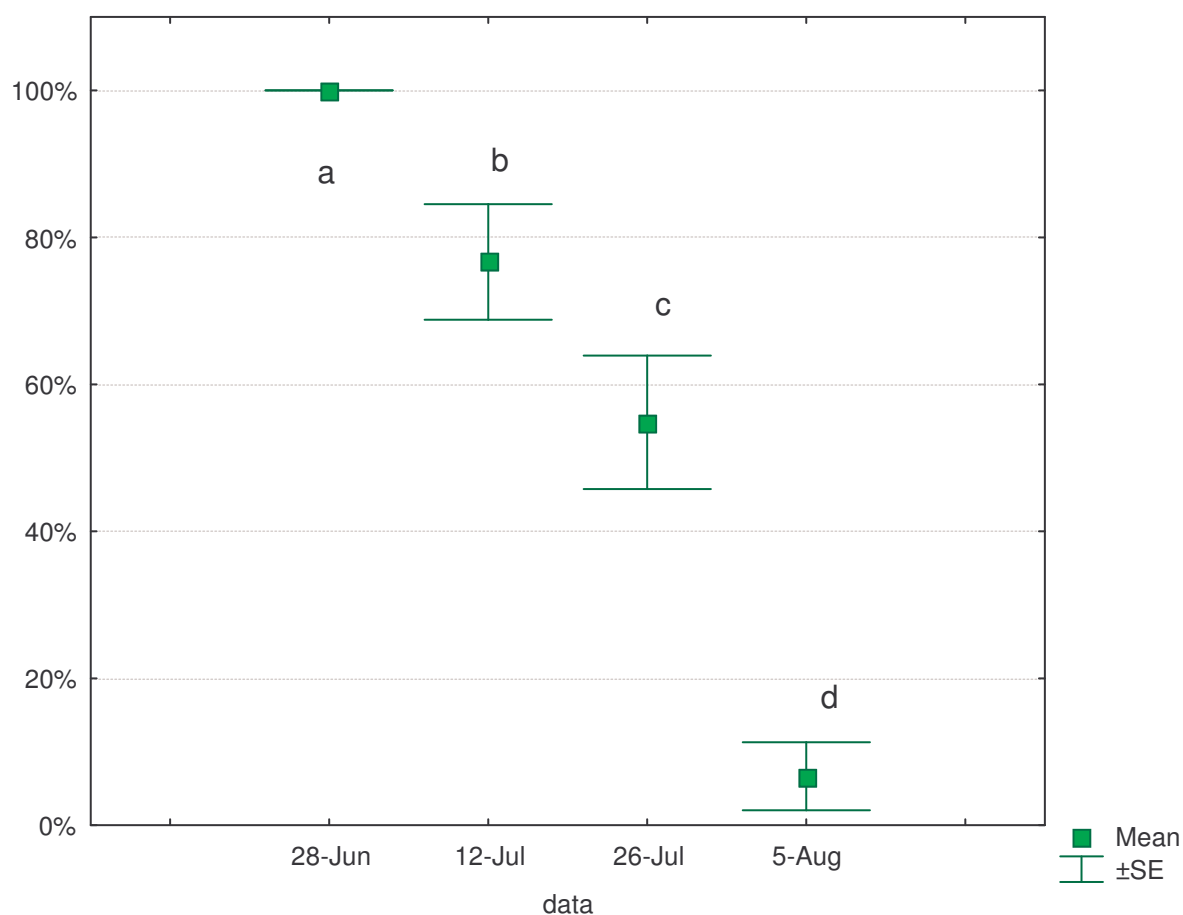
Dopo il primo inoculo di *M. albidus* (26/4/08) la percentuale di tombini che al campionamento presentano copepodi decresce in modo brusco fino a raggiungere il 6% al campionamento del 28 giugno (Fig.1).

**Fig.1** Percentuale di tombini con *Macrocyclus albidus* dopo l'introduzione (26/4/08) fino al 28/6/08



Dopo un mese dalla seconda introduzione, la percentuale di tombini con copepodi è del 54,8% e si abbassa al 6,67% al terzo ed ultimo campionamento (5 agosto) (Fig.2).

**Fig.2** Percentuale di tombini con *Macrocyclus albidus* dopo la seconda introduzione (28/6/08) fino al 5/8/08

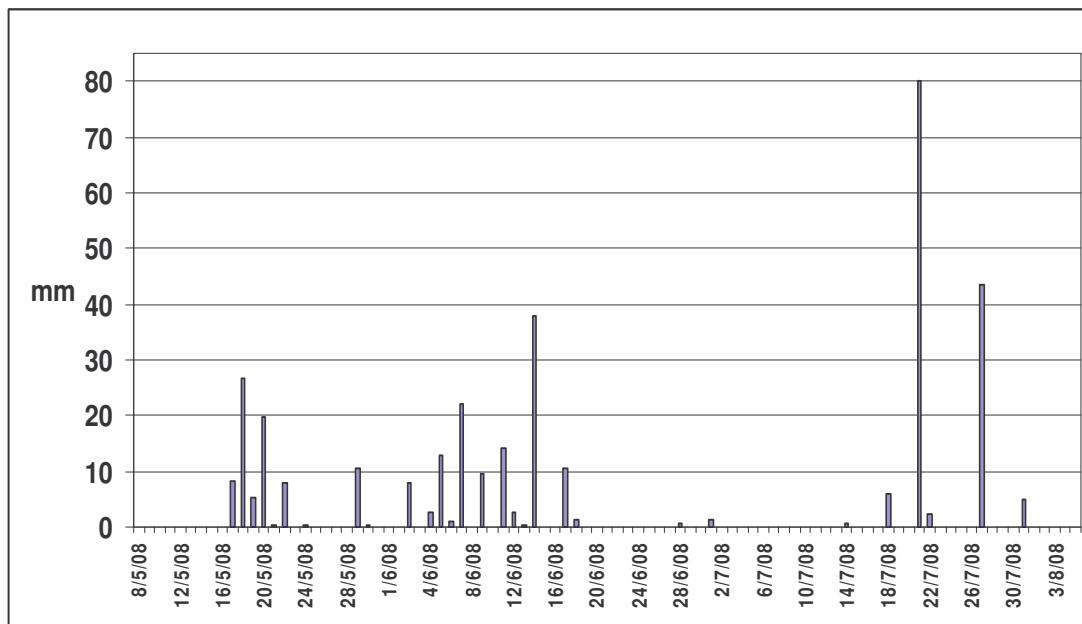


Il periodo di prova è stata caratterizzato da un andamento particolarmente piovoso con precipitazioni frequenti e rovesci in varie occasioni di forte intensità. Nel periodo compreso tra il 26 aprile e il 28 giugno, sull'area sono caduti infatti 202 mm di pioggia; successivamente fino al 5 agosto, la pioggia è stata di 140 mm di cui 80 mm caduti in un solo episodio (21 luglio) (Fig.3).

Sotto questi livelli di pioggia i tombini sono stati sottoposti a un continuo e probabilmente completo dilavamento che potrebbe aver impedito la colonizzazione stabile dei copepodi.

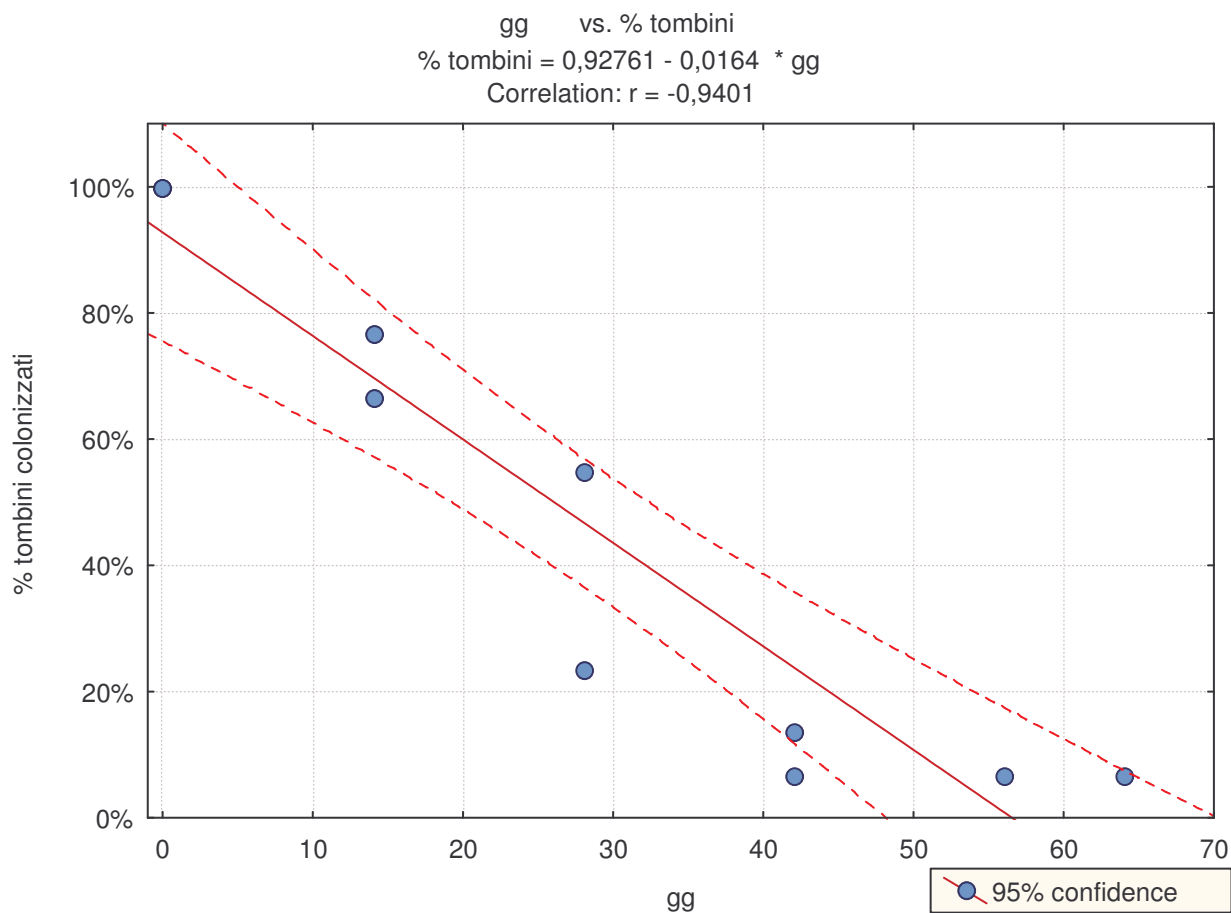
Tuttavia non si osservano influenze significative della pioggia nella riduzione percentuale dei tombini colonizzati da copepodi ( $F_{1,6} = 1,88$  e  $P=0,22$ ) e ciò fa propendere all'ipotesi che assieme alla pioggia siano anche le caratteristiche fisico-chimiche dell'acqua a impedire una colonizzazione stabile da parte di *M. albidus*.

**Fig.3** Pioggia caduta a San Carlo (FE) tra il 26 aprile e il 5 agosto 2008



Interessante è la relazione lineare ( $F_{1,8} = 60,83$  e  $p < 0,0001$ ) tra la percentuale di tombini colonizzati e i giorni dall'introduzione dei copepodi (Fig.4).

**Fig.4** Retta di regressione lineare della percentuale di tombini con *M.albidus* al trascorrere dei giorni dalla sua introduzione



Tale relazione permette di utilizzare l'equazione

$$\% = 0,93 - 0,02 \text{ gg}$$

per calcolare la percentuale di tombini colonizzati in funzione dei giorni dall'inoculo dei copepodi. Il tempo di dimezzamento dei tombini colonizzati è di 26,07 giorni dall'inoculo.

Riguardo invece la dinamica di infestazione culicidica è stato osservato che nel primo campionamento (26 aprile) in nessun tombino sono state campionate larve che compaiono per la prima volta il 10 maggio (soltanto in 2 tombini su 30), appartenenti a *Cx. pipiens*. *Ae. albopictus* è stata invece campionata la prima volta il 6 giugno.

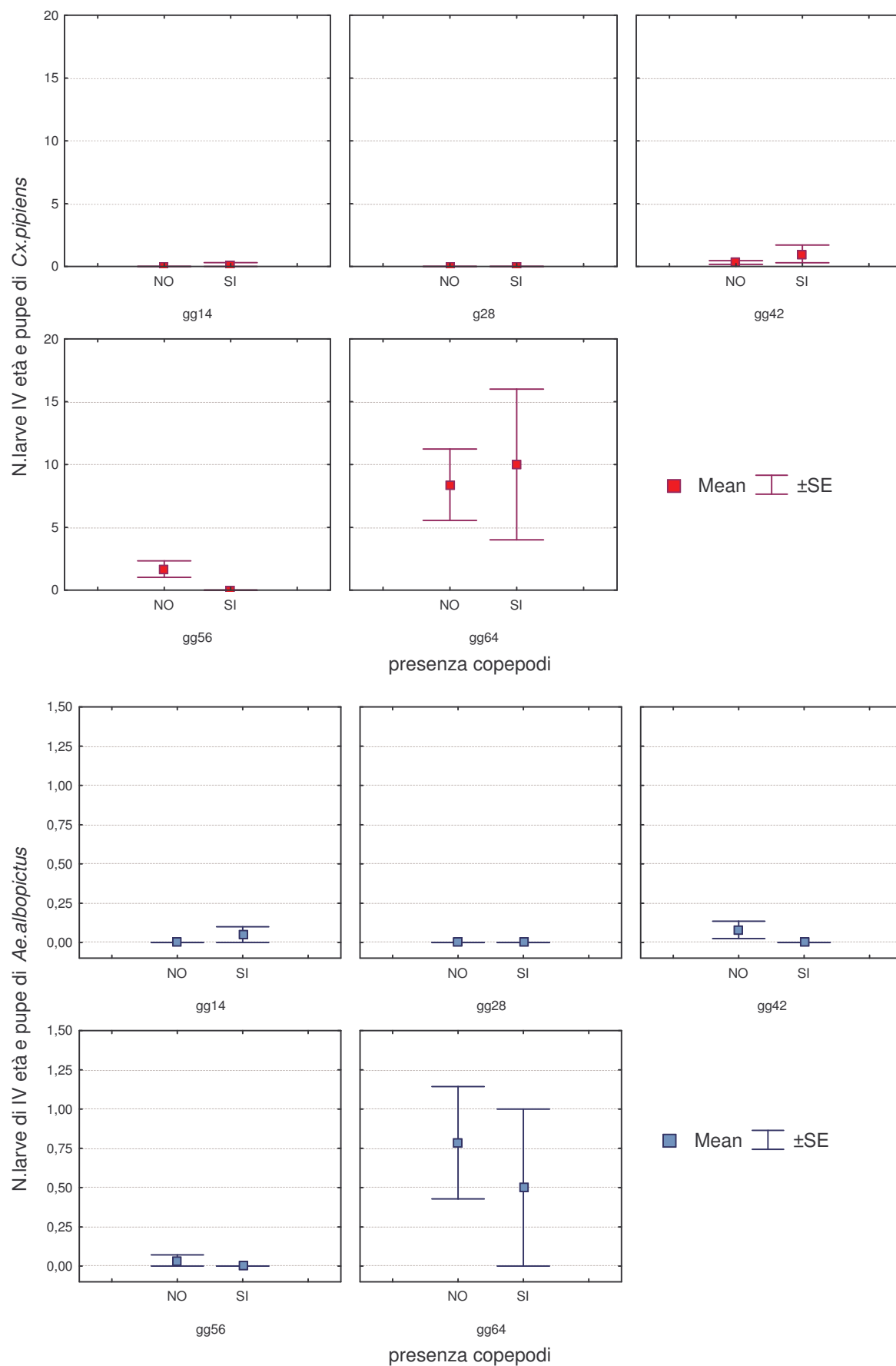
Dopo la prima inoculazione fino a quella successiva la popolazione di larve mature e pupe di *Cx. pipiens* nei tombini che mantengono i copepodi risulta inferiore mediamente del 70% rispetto a quelli nei quali non si rinvenivano copepodi. Per *Ae. albopictus* invece la densità di larve e pupe media campionata è inferiore del 76% nei tombini con presenza di copepodi rispetto a quelli senza. (Tab.1; Fig.1).

Tuttavia per entrambe le specie all'analisi della varianza (ANOVA) le differenze tra le densità medie campionate nei tombini con e senza copepodi è risultata non significativa (per *Cx.pipiens*  $F_{1,4}=0,12$ ;  $p=0,75$ ; per *Ae.albopictus*  $F_{1,4}=1,63$ ;  $p=0,27$ ).

**Tab.1** Densità medie di larve (3<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup> età e pupe) delle specie culicidiche campionate nei tombini con ("SI") e senza ("NO") *Macrocyclus albidus* nel periodo 26/4-28/6 2008

presenza copepodi	N	<i>Cx.pipiens</i>		<i>Ae.albopictus</i>	
		Media	DS	Media	DS
NO	113	2,566372	8,316159	0,221239	0,997627
SI	35	0,771429	2,818904	0,057143	0,235504
All Grps	148	2,141892	7,424001	0,182432	0,880918

**Fig.1.** Andamento delle densità medie di larve di 3<sup>a</sup>-4<sup>a</sup> età e pupe di *Culex pipiens* e *Aedes albopictus* nei 30 tombini campionati ad ogni sopralluogo dopo l'introduzione di *Macrocyclus albidus* (26 aprile) al 28 giugno. In ordinata il numero di giorni dall'introduzione dei copepodi.





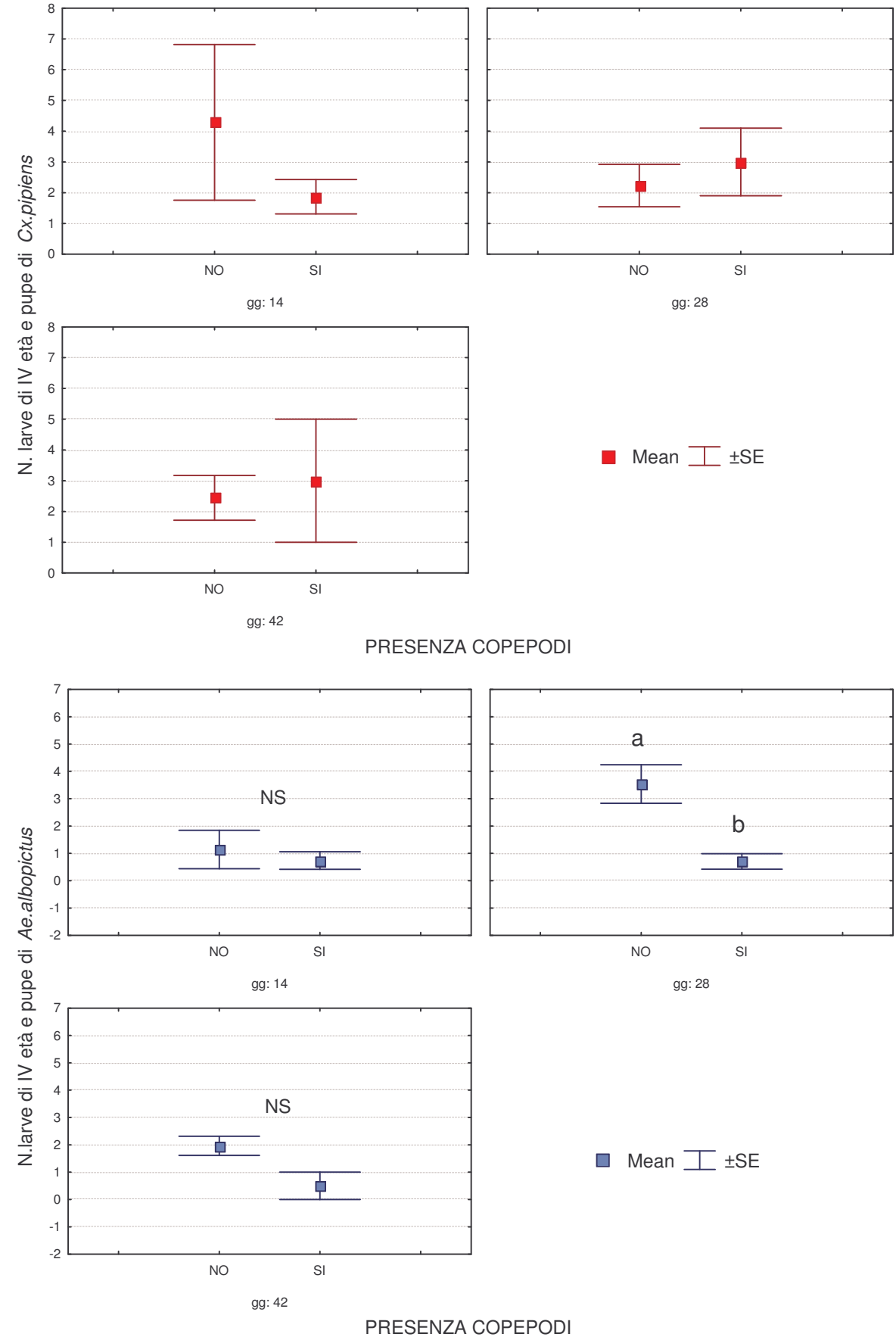
Dopo la seconda inoculazione la popolazione di larve mature e pupe di *Cx. pipiens* nei tombini che mantengono i copepodi risulta inferiore mediamente del 10,5% rispetto a quelli nei quali non si rinvenivano copepodi. Per *Ae. albopictus* invece la densità di larve e pupe media campionata è inferiore del 68,9% nei tombini con presenza di copepodi rispetto a quelli senza. (Tab.2; Fig.2).

In questo solo per *Ae.albopictus* si osservano differenze significative nei tombini con o senza *M.albidus*. (per *Cx.pipiens*  $F_{1,4}=0,12$ ;  $p=0,73$ ; per *Ae.albopictus*  $F_{1,4}=16,13$ ;  $p<0,001$ ).

**Tab.2** Densità medie di larve (3<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup> età e pupe) delle specie culicidiche campionate nei tombini con ("SI") e senza ("NO") *Macrocyclus albidus* nel periodo 26/4-28/6 2008  
SECONDA PROVA

Presenza di Copepodi	N	Cx.pipiens		Ae.albopictus	
		Media	DS	Media	DS
NO	47	2,659574	4,006932	2,276596	2,173978
SI	42	2,380952	3,519648	0,714286	1,348635
All Grps	89	2,528090	3,766147	1,539326	1,983203

**Fig.2** Andamento delle densità medie di larve di 3<sup>a</sup>-4<sup>a</sup> età e pupe di *Culex pipiens* e *Aedes albopictus* nei 30 tombini campionati ad ogni sopralluogo dopo l'introduzione di *Macrocyclus albidus* (28 giugno) al 5 agosto. In ordinata il numero di giorni dall'introduzione dei copepodi.



## Bibliografia citata

- Dussart B.H.. 1969. Les Copépodes des Eaux Continentales d'Europe Occidentale. Tome II: Cyclopoïdes et Biologie. N. Boubée et Cie., Paris. 292 pp.
- Marten G.G. 1990. Elimination of *Aedes albopictus* from tire piles by introducing *Macrocyclus albidus* (Copepoda Cyclopidae). *J. Amer. Mosq. Control Assoc.*; 6: 689-93
- Stoch F.. 1989. I Ciclopoidi (Crustacea, Copepoda) delle acque interne italiane ad est del F. Piave: considerazioni faunistiche e biogeografiche.. *Biogeographia*; 13:539-551
- Tinson S., Laybourn-Parry J.. 1985. The behavioural responses and tolerance of freshwater benthic cyclopoid copepods to hypoxia and anoxia. *Hydrobiologia*; 127 (3): 257-263

## CONSIDERAZIONI FINALI

Il lavoro fin qui svolto ha portato a considerare *Macrocyclus albidus* un interessante ausiliario applicabile anche nelle realtà urbane del nostro paese nell'ambito di programmi integrati di contrasto alle infestazioni di *Aedes albopictus*. Tuttavia il suo utilizzo non si presta a tutti i focolai larvali ma soltanto a raccolte di acqua artificiali di un certo volume come i bidoni utilizzati per stoccare acqua impiegata per l'orto e il giardino familiare.

Ripercorrendo le fasi della ricerca e in base a quanto ottenuto in ciascuna di esse è possibile formulare una serie di considerazioni che aiutano meglio a fare il punto sull'argomento e sottolineare le criticità che potrebbero sorgere con l'impiego dei copepodi ciclopidi.

Il metodo di laboratorio adottato per valutare le prestazioni predatorie di ogni specie di ciclopoide, si conferma come un primo necessario approccio in grado di fornire informazioni immediate per lo sviluppo della ricerca. Sottoporre a uno o più esemplari insieme, un numero prestabilito di larve giovani di zanzara, infatti è risultato uno screening fondamentale per promuovere o meno le quattro specie testate nonché per la scelta di quella candidata alle prove di semicampo e di campo condotte successivamente. Nel merito, le prove in condizione di laboratorio hanno evidenziato le buone prestazioni di predazione a 24 ore di *Macrocyclus viridis* e *Macrocyclus albidus* nei confronti di larve di 1<sup>a</sup> età di *Ae. albopictus* che hanno predato, rispettivamente una media di 40 e 28 larve.

In studi di efficacia sempre di laboratorio con *M. viridis* contro *Ae. albopictus*, sono stati ottenuti livelli di efficacia inferiori anche se in linea con quelli del test di laboratorio (Dieng et al., 2002a; Dieng et al., 2002b). *M. albidus* invece ha fatto ottenere livelli di predazione a 24 ore migliori (44 larve/24 ore) (Marten, 1990b; Marten et al., 2000) o del tutto simili (Rey et al. 2004).

Nei confronti di *Culex pipiens*, *M.albidus* ha condotto a morte 30 e 40 larve rispettivamente a 24 e 48 ore. Si tratta di ottime prestazioni che tuttavia non sono state confermate anche nelle prove di semicampo e di campo nei bidoni e nei tombini. In questo caso è stato ottenuto un livello di controllo inferiore rispetto a quello ottenuto contro *Ae.albopictus*, confermando quanto ricavabile dalla letteratura che indica i ciclopidi meno efficienti nei confronti di *Anopheles* spp. e di *Culex* spp. (Rivière & Thirel, 1981; Marten, 1989; Brown et al., 1991a; 1991b; Marten et al., 1994a, 2000b; Blaustein & Margalit, 1994 ; Pérez-Serna et al., 1996; Micieli et al. 2002; Soumare et al. 2004).

La minore efficacia nei confronti di *Culex* e *Anopheles*, potrebbe trovare spiegazione nella maggiore presenza di spine sul corpo delle larve e questo determinerebbe un sensibile incremento degli attacchi a vuoto del copepode. Una seconda spiegazione potrebbe riferirsi alla maggiore motilità delle larve di *Ae. albopictus* e *Ae. aegypti* che farebbe aumentare la probabilità dell'individuazione e del contatto tra preda e predatore.

Nella prova di predazione *Acanthocyclops robustus* si è dimostrata poco efficiente in grado di predare la media di 18 e 21 larve rispettivamente a 24 e 48 ore, confermando che la dimensione corporea non è soltanto l'unico fattore determinante le prestazioni predatorie.

La soglia di 30 o 40 larve/giorno proposta da Marten et al. (2000), considerata la prestazione minima per promuovere la specie candidata all'impiego in campo, dovrebbe tenere conto delle condizioni in cui si

svolge il test di predazione. Le dimensioni del contenitore, la temperatura, lo stato di nutrizione dei ciclopidi e le preferenze alimentari nel caso di compresenza di prede alternative, sono fattori che potrebbero dare origine a risposte di predazione differenti (Rao & Kumar, 2002; Kumar & Rao, 2003; Kumar, 2005).

Inoltre resta aperta la possibilità, come osservato nella prova con *Thermocyclops crassus*, che la predazione sia massima al 2° giorno portando a morte complessivamente nell'arco delle 48 ore un numero di larve simile a quelle predate dalle specie che si sono dimostrate più performanti nelle prime 24 ore.

La scelta di privilegiare nel proseguo dello studio *M. albidus*, rispetto a *M. viridis* e *T. crassus*, ha trovato ragione nella necessità di concentrarsi su una sola specie di cui erano disponibili in bibliografia interessanti risultati nei confronti di *Ae. albopictus* e di *Cx. pipiens* (Tabb.1 e 2). Nella totale assenza di esperienze italiane ed europee su altre specie autoctone a cui riferirsi, è stato necessario concentrarsi su una sola specie dedicando ad essa tempo ed energie per metterne a punto la tecnica di allevamento evitando il rischio di incorrere in insuccessi nelle fasi iniziali della ricerca e l'abbandono del progetto.

**Tab.1** Studi sulla predazione di *Macrocyclops albidus* in prove di laboratorio (da Marten, 2007 modificata)

Specie culicidica bersaglio	Paese	Autore/i (anno)
Specie non menzionata	LOUISIANA, USA	Nasci et al. (1987)
<i>Ae. albopictus</i>	LOUISIANA, USA	Marten (1984)
<i>Ae. albopictus</i>	LOUISIANA, USA	Marten (1989,1990)
<i>Cx. pipiens</i>	NUEVO LÈON, MEXICO	Pérez-Serna et al. (1996)
<i>An. quadrimaculatus</i>	LOUISIANA, USA	Marten et al. (2000b)
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	LOUISIANA, USA	Marten et al. (2000a)
<i>Ae. albopictus</i>	FLORIDA, USA	Rey et al (2004)
<i>Ae. aegypti</i>	HONDURAS	Marten et al. (1994b)
<i>Ae. aegypti</i>	TRINIDAD	Rawlins et al. (1997)
<i>Ae. aegypti</i>	CUBA	Menéndez-Díaz et al. (2004)
<i>Ae. albopictus</i>	BRAZIL	Santos & Andrade (1997)
<i>Cx. pipiens</i>	URUGUAY	Calliari et al. (2003)

La seconda fase della ricerca ha rappresentato la tappa fondamentale di verifica dell'applicabilità di *M. albidus*.

Una specie è candidata per la lotta biologica se oltre ad essere buona predatrice, ha la capacità di colonizzare i focolai larvali per un tempo sufficientemente lungo da renderla conveniente rispetto a modalità di lotta alternative come ad es. l'impiego di sostanze larvicide. La colonizzazione è possibile soltanto se negli ambienti di "lancio" i copepodi sono in grado di riprodursi e aumentare così la sua popolazione. Inoltre, presupponendo l'indisponibilità di enormi quantità di esemplari, occorre mettere a punto le dosi minime di inoculo a seconda della tipologia di focolaio larvale, tali da consentire di raggiungere alte densità nel più breve tempo possibile. Ovviamente alla colonizzazione stabile della raccolta d'acqua inoculata deve seguire un efficiente e costante controllo delle zanzare che la utilizzano. La possibilità che le prestazioni di laboratorio non siano confermate nelle condizioni reali di campo è un'evenienza che si è verificata per varie specie (Marten & Reid, 2007).

**Tab.2** Studi sulla predazione di *Macrocyclus albidus* in prove di campo (da Marten & Reid, 2007 modificata e integrata)

Specie culicida bersaglio	Focolaio larvale	Paese	Autore/I (anno)
<i>Ae aegypti</i>	Bidoni, pneumatici, contenitori artificiali	Honduras	Marten (1992, 1994a, 1994b)
<i>Ae. albopictus</i>	Pneumatici, secchi	Louisiana, USA	Marten (1994a)
<i>Oc. sollicitans</i>	Pozze temporanee, aree umide naturali	Louisiana, USA	Marten (1994a)
<i>Ae aegypti</i>	Pneumatici, serbatoi in cemento, bidoni, vasi per fiori	Honduras	Marten et al. (1994b)
<i>An. quadrimaculatus</i>	Risaie	Louisiana, USA	Marten et al. (2000a)
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	Fossi stradali	Louisiana, USA	Marten et al. (2000b)
<i>Ae. albopictus</i> <i>Ae aegypti</i>	Pneumatici	Florida, USA	Rey et al. (2004)
<i>Cx. pipiens</i>	Vasi portafiori di cimitero	Uruguay	Pons et al., 2008

Le prove nei bidoni in condizioni di semicampo hanno dimostrato un'eccellente prestazione di *M.albidus* specialmente nei confronti di *Ae.albopictus* garantendo un controllo completo durante l'arco di due intere stagioni riproduttive per le zanzare. La colonizzazione stabile dei bidoni, nella zona ombreggiata dalle piante e in quella in pieno sole, oltre all'efficienza predatoria, è un dato sorprendente se paragonato ai risultati ottenuti in uno studio simile condotto da Marten et al. (1994) dove *M. albidus* sparisce dopo tre mesi dall'introduzione nei bidoni perché non è in grado di sopportare temperature superiori a 37-38 °C. Considerando le temperature massime dell'acqua nei bidoni mantenuti al sole nell'estate 2007 sono stati 9 i giorni in cui esse hanno raggiunto o superato i 40 °C, con un picco di 42 °C; inoltre sono stati complessivamente 21 i giorni in cui è stata registrata una temperatura superiore a 37 °C. La temperatura al fondo nei bidoni pieni è di qualche grado inferiore a quella della superficie mentre, quando per effetto dell'evaporazione l'acqua raggiunge il minimo volume ( 50-70 l), la temperatura è omogenea lungo tutta la colonna.

Un secondo importante risultato è stata la risposta di *M.albidus* anche alle basse temperature registrate nei mesi più freddi (da novembre 2007 a febbraio 2008) che ha consentito la sopravvivenza dei copepodi e la loro ripresa alla primavera 2008. Nel suddetto periodo la temperatura minima dell'aria a 2 m di altezza, registrata nella zona (fonte ARPA Emilia-Romagna), è stata di 0 °C e i giorni in cui la minima è stata inferiore a tale valore sono stati poco più di 60, di cui 20 consecutivi. Evidentemente lo strato di ghiaccio che si è osservato in queste giornate ha permesso di mantenere l'acqua a 0 °C limite di sopravvivenza per *M.albidus* (Marten et al., 1994a).

Nella prova condotta nei serbatoi in condizioni di campo il livello medio di controllo di *Ae. albopictus* rispetto al testimone non è statisticamente significativo nonostante si osservi una presenza media di larve e pupe inferiore del 96%. La variabilità ai campionamenti è molto alta sia nei bidoni testimoni che in quelli trattati; non è da escludere che a ciò abbia contribuito l'attività larvicida di *B.t.i.*, che si è prolungata in alcuni serbatoi oltre la 3<sup>a</sup> settimana dal trattamento.

Come accennato, nei confronti di *Cx. pipiens*, in contrasto con le prestazioni ottenute in laboratorio, l'efficacia nei bidoni in semicampo è risultata parziale anche se mediamente la riduzione rispetto al testimone è stata dell'84,7-88,7% (2007) e 73% (2008). Un simile risultato anche se non significativo è stato ottenuto nella prova dei serbatoi in pieno campo.

I bidoni utilizzati nella prova di semicampo, caratterizzati da acqua stagnante mai prelevata o aggiunta e con una buona carica organica in decomposizione fornita dalle foglie degli alberi, avevano una forte attrattività per le femmine gravide di *Cx. pipiens*, dimostrata dal numero di ovature galleggianti che si potevano osservare (10-20) e dal numero medio di giovani larve che si contavano durante i campionamenti. E' perciò probabile che l'alto numero di larve saturava la capacità predatorie della popolazione del ciclopoide che all'interno di ogni bidone, oltre una certa densità evidentemente non è potuta aumentare.

Nel caso dei serbatoi per la riserva di acqua una possibile causa di fallimento dei ciclopidi è rappresentata dalla soppressione delle densità a seguito del continuo prelievo di acqua e con essa anche dei copepodi (Marten e Reid, 2007).

Nella prova nei bidoni di campo, per l'intera durata delle osservazioni, i copepodi sono sempre stati ritrovati nonostante fossero sottoposti a periodici parziali prelievi dell'acqua. In questo caso la tendenza di *M.albidus* di nuotare sul fondo e vicino ai bordi ostacola il suo allontanamento quando si preleva acqua, ad es. con un innaffiatoio o un secchio (Marten, 1994). Una caratteristica etologica importante che insieme alla capacità di adattamento ad un range di temperature molto ampio conferma la versatilità di tale specie. Altre specie come *Msocyclops thermocyclopoides* e *Mesocyclops venezolanus* concentrandosi lungo la colonna di acqua tendono a essere rimossi in gran numero ad ogni prelievo. Il loro declino non viene compensato dal tasso riproduttivo e così la popolazione tende a sparire (Marten et al., 1994b).

Lo studio che ha riguardato i tombini stradali consente di considerare inadatto l'utilizzo di *M.albidus* in quanto la colonizzazione dei copepodi in tale importante tipologia di focolaio larvale culicidico non è stabile nel tempo ma decresce, più o meno rapidamente, per effetto probabilmente delle caratteristiche chimico-fisiche dell'acqua (accumulo di sostanze tossiche e carenza di ossigeno) e del dilavamento dovuto alle precipitazioni. Nella prova del 2007, nel periodo di 103 giorni, la media dei tombini ritrovati con copepodi è stata del 77%. Le percentuali di colonizzazione dei tombini sono state invece molto inferiori nella prova su larga scala del 2008 dove si è assistito ad un rapido crollo dopo le due successive introduzioni raggiungendo valori del 6% e del 6,7% rispettivamente dopo 60 e 40 giorni. In una prova simile effettuata in Colombia utilizzando *Mesocyclops longisetus* in 8 mesi la percentuale media di tombini che hanno mantenuto il ciclopoide è stata del 49,2% (Suarez-Rubio & Suarez, 2004).

Nonostante nei confronti di *Ae. albopictus* la predazione in entrambe le due sperimentazioni abbia portato a sensibili livelli di riduzione nei tombini con i copepodi, tuttavia ciò non è compensato dalla percentuale molto alta di tombini che rimangono senza i copepodi. Ciò costringerebbe a ripetute introduzioni dei ciclopidi i cui costi attualmente non sono inferiori a quelli per trattamenti con prodotti larvicidi.

In definitiva, mentre nei tombini l'utilizzo dei copepodi non sembra realizzabile, nei bidoni contro *Ae. albopictus* rappresenta un'alternativa interessante alle tecniche di lotta che comunemente sono

consigliate o obbligate nel caso dell'ordinanza sindacale che tutti i comuni di pianura e collina dell'Emilia-Romagna hanno emanato dopo l'epidemia di Chikungunya che ha interessato la Romagna nel 2007.

L'indicazione che viene diffusa è di carattere preventivo: si richiede di mantenere ermeticamente chiusa l'apertura in modo da impedire il passaggio delle femmine ovideponenti. Tuttavia raramente la chiusura risulta idonea in quanto vengono utilizzati materiali di risulta che lasciano spazi di passaggio alle femmine di zanzara. La copertura inefficace aumenta la potenzialità produttiva del focolaio riducendone l'esposizione al sole, elemento di forte deterrenza in particolare per *Ae.albopictus*.

Alternativa alla chiusura ermetica dei serbatoi o al loro completo svuotamento settimanale è l'introduzione di qualche esemplare di *Gambusia holbrooki* Baird (Cyprinodontiformes, Poeciliidae) (WHO, 1995; WHO, 1997; Donati et al. 2006).

Rispetto all'utilizzo di pesci da immettere nei bidoni, *M.albidus* offrirebbe il vantaggio di resistere alle temperature soglia per la sopravvivenza del pesce, col risultato che riuscirebbe a superare la stagione invernale e il suo impiego si adatterebbe anche ai serbatoi in pieno sole.

Naturalmente l'utilizzo dei copepodi nei serbatoi non esime dalla necessità di provvedere ad un minimo di formazione a coloro che gestiscono tali riserve di acqua. Tra i fattori che impediscono lo sviluppo di una colonia di ciclopoidi numerosa e stabile nei contenitori, come detto, sono i continui prelievi di acqua, la possibilità di introduzione di sostanze insetticide non selettive (come ad es. piretroidi o larvicidi del gruppo dei "regolatori di crescita degli insetti" come diflubenzuron e pyriproxyfen) e ovviamente il verificarsi del caso limite, ossia il completo svuotamento (generalmente nel caso dei bidoni negli orti può avvenire in autunno) che porta all'estinzione completa della colonia. Mentre si sottolinea ancora una volta che il prelievo parziale di acqua nel caso di *M.albidus* difficilmente allontana tutti gli esemplari dal serbatoio, mitigare l'impatto dei possibili svuotamenti completi richiede, come nell'esperienza in Vietnam descritta nella parte introduttiva, una incisiva azione di sensibilizzare le persone affinché in occasione degli svuotamenti completi una parte dell'acqua sia mantenuta da parte e reintrodotta dopo l'operazione di pulizia.

Un ostacolo principale all'utilizzo dei copepodi in tipologie diverse dai grandi serbatoi per l'acqua, come i contenitori non eliminabili che possono riempirsi di acqua occasionalmente (ad es. i vasi portafiori dei cimiteri e i sottovasi) è l'incapacità di molte specie dei copepodi di resistere all'essiccamento. Ciò vale per anche per *M. albidus* che può sopravvivere nel fango o su un substrato umido di materiale vegetale in decomposizione ma non in contenitori completamente asciutti (Marten, 1990a).

Sulla questione di quanti copepodi deve essere l'inoculo iniziale, la prova di semicampo nei bidoni permette di concludere che 100 esemplari di *M. albidus* per bidone con 200 l di acqua inseriti in primavera consente un aumento della popolazione uguale a quella ottenuta con un inoculo 5 volte più alto. In questo caso la polifagia dei ciclopoidi rappresenta un vantaggio perché permette introduzioni anticipate a dosi ridotte anche in assenza di larve di culicidi.

Nello stesso tempo però la polifagia all'opposto può essere uno svantaggio specie in presenza di prede alternative alle larve di zanzara. Sulla base di ciò nella fase di selezione delle specie di ciclopoidi candidate, sarebbe utile procedere con specifiche prove.

Resta anche da considerare se spingere l'introduzione dei copepodi nei serbatoi d'acqua con un mix di specie, mutuando dall'esperienza vietnamita gli ottimi risultati ottenuti (Nam et al.1998) o da quella in piccola scala condotta da Dieng et al. (2002) contro *Ae. albopictus* in cui *Macrocyclops distinctus*,



*Megacyclops viridis* e *Mesocyclops pehpeiensis* inoculati insieme hanno determinato livelli di contenimento larvale migliori di quelli ottenuti da ciascuna specie singolarmente. In altre situazioni, invece, la coesistenza non ha rappresentato un vantaggio per la tendenza di una specie di prevalere sulle altre (Marten, 1990b).

Un vantaggio molto interessante del metodo dei copepodi che si somma all'efficacia della predazione, è l'effetto "ovitrappola" osservato nell'esperienza su larga scala in Vietnam (Kay & Nam, 2005). In quel contesto *Ae. aegypti* sparì senza che i copepodi venissero rivenuti in tutti i contenitori. Le femmine gravide in cerca di un luogo adatto ad accogliere le proprie uova non sono in grado di discriminare i contenitori con i copepodi da quelli senza per cui l'ovideposizione, in presenza di copepodi, contribuisce al collasso della popolazione di zanzara per la competizione che i serbatoi con i ciclopidi esercitano nei confronti di quelli senza.

In studi specifici successivi, infatti, si è potuto confermare che la presenza di copepodi non ha un effetto repellente nei confronti delle femmine di zanzara ovideponente, anzi si è osservato in laboratorio ad es. che *Mesocyclops longisetus* attrae *Ae. aegypti*, probabilmente stimolata dalle sostanze volatili del metabolismo dei copepodi che agirebbero così da caimoni, che va a ovideporre nei contenitori dove il ciclopoide è presente rispetto a quelli senza (Torres-Estrada et al., 2001). Questo fenomeno si potrebbe sfruttare come metodo di lotta cosiddetto "attract and kill" nei confronti di *Ae. albopictus*, potenziandolo combinando i copepodi con *B.t.i* (Tietze et al., 1994, Chansang et al. 2004).

Le prove di allevamento e in particolare quelle inerenti il confronto tra tipi di dieta diversi, ha consentito di implementare un allevamento massale pilota al chiuso di *M. albidus* che ogni 15-16, giorni alla temperatura costante di 22°C-23°C permette di fornire molte migliaia di nuovi individui. Le vasche utilizzate sono in plastica di capacità massima di 100 l; riempite con 15-20 l di acqua di acquedotto clorata sono mantenute alla temperatura costante di 22°C con un riscaldatore da acquario e sottoposte a illuminazione naturale. Per rallentare l'evaporazione ogni vasca è ricoperta con una lastra di plexiglass.

Il parametro fondamentale per il successo dell'allevamento è la concentrazione del mix di protozoi ciliati e rotiferi che deve essere mantenuta il più elevata possibile fornendo periodicamente cibo secco tritato per gatti nella giusta quantità. Una dose troppo scarsa impedisce lo sviluppo di batteri e con essi quello dei ciliati e dei rotiferi, con il conseguente crollo dei ciclopidi per affamamento; al contrario una dose troppo alta instaura reazioni putrefattive letali per *M.albidus*.

Un sistema galleggiante rimovibile, costituito da una cornice rivestita da una rete con maglia di 0,1 mm, permette di mantenere separati i copepodi riproduttori dalla prole, impedendo il cannibalismo sui nauplii e sui copepoditi. Da questo sistema ogni due settimane è possibile ottenere soltanto dei neo-adulti e consente di poter continuare con un ciclo successivo riempiendo nuovamente la vasca con acqua pulita e con qualche litro di acqua "vecchia", come inoculo per ricostituire rapidamente la colonia di ciliati e rotiferi. Le quantità ottenute di *M. albidus* possono essere stoccate anche due mesi a temperatura di 6°C.

## Bibliografia citata

- Blaustein L, Margalit J. 1994. Differential vulnerability among mosquito species to predation by the cyclopoid copepod, *Acanthocyclops viridis*. *Israel J Zool* 40:55-60
- Calliari D., Sanz K., Martínez M., Cervetto G., Gómez M., Basso C.. 2003. Comparison of the predation rate of freshwater cyclopoid copepod species on larvae of the mosquito *Culex pipiens*. *Medical and Veterinary Entomology* ; 17 (3): 399
- Chansang U., Bhumiratana A., Kittayapong P.. 2004. Combination of *Mesocyclops thermocyclopoides* and *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*: A better approach for the control of *Aedes aegypti* larvae in water containers. *J. Vector Ecol.*; 29: 218-226
- Dieng H., Boots M., Tuno N., Tsuda Y, Takagi M.. 2002b. Life history effects of prey choice by copepods: implications for biocontrol of vector mosquitoes. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*; 19(1): 67-73
- Dieng H., Boots M., Tuno N., Tsuda Y., Takagi M.. 2002a. A laboratory and field evaluation of *Macrocyclus distinctus*, *Megacyclus viridis* and *Mesocyclops pehpeiensis* as control agents of the dengue vector *Aedes albopictus* in a peridomestic area in Nagasaki, Japan. *Medical and Veterinary Entomology*; 16: 285-291
- Donati L., Veronesi R., Colonna R., Bellini R.. 2006. Gambusia nella lotta alle zanzare nei bidoni degli orti. *Igiene Alimenti Disinfestazione & Igiene Ambientale*, 23(4): 39-46
- Jennings C.D., B. Phommasack, B. Sourignadeth, B.H. Kay. 1995. *Aedes aegypti* control in the Lao People's Democratic Republic, with reference to copepods. *Am J. Trop. Med. Hyg.*; 53: 324-330
- Kumar R, Rao T.R... 2003. Predation on mosquito (*Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus*) larvae by *Mesocyclops thermocyclopoides* (Copepoda: Cyclopoida) in the presence of alternate prey. *Int. Rev. Hydrobiol.*; 88: 570-581
- Kumar R., T. Ramakrishna Rao. 2003. Predation on Mosquito Larvae by *Mesocyclops thermocyclopoides* (Copepoda: Cyclopoida) in the presence of alternate prey. *International Review of Hydrobiology*; 88 (6): 570-581
- Kumar R.. 2005. Feeding modes and associated mechanisms in zooplankton. In A Kumar, ed. *Ecology of plankton*. New Dehli: Daya Publishing House, pp. 228-265
- Marten G.G.. 1990a. Elimination of *Aedes albopictus* from tire piles by introducing *Macrocyclus albidus* (Copepoda, Cyclopidae). *J. Am. Mosq. Control Assoc.*; 6: 689-693
- Marten G.G.. 1990b. Evaluation of cyclopoid copepods for *Aedes albopictus* control in tires. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*; 6: 681-688
- Marten G.G., Astaiza R., Suarez M.F., Monje C., Reid J.W.. 1989. Natural control of larval *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) by the predator *Mesocyclops* (Copepoda: Cyclopoida). *J. Med. Entomol.*; 126: 624-627
- Marten G.G., Bordes E.S., Nguyen M.. 1994a. Use of cyclopoid copepods for mosquito control. *Hydrobiologia*; 292/293: 491-496
- Marten G.G., Borjas G., Cush M., Fernandez E., Reid J.W.. 1994b. Control of larval *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) by Cyclopoid Copepods in peridomestic breeding containers. *J. Med Entomol.*; 31(1): 36-44
- Marten G.G., Nguyen M., Ngo G.. 2000a. Copepod predation on *Anopheles quadrimaculatus* larvae in rice fields. *J. Vector Ecol.*; 25: 1-6

- Marten G.G., Nguyen M., Mason B.J., Ngo G.. 2000b. Natural control of *Culex quinquefasciatus* larvae in residential ditches by the copepod *Macrocyclus albidus*. *J. Vector Ecol. Jun.*; 25(1): 7-15
- Marten G.G., Reid J.W.. 2007. Cyclopoid copepods. *The American Mosquito Control Association*, Inc. 23(2): 65-92
- Menéndez-Díaz Z., Suairez-Delgado S., Rodríguez-Rodríguez J., García-Avila I., Díaz-Pérez M., García-García I.. 2004. Evaluación de *Macrocyclus albidus* (J.) para el control larval de *Aedes aegypti* (L.) bajo condiciones de laboratorio en Cuba. *Revista Cubana Med. Trop.* ; 56(3): 227-229
- Micieli M.V., Martí G.A., García J.J.. 2002. Laboratory evaluation of *Mesocyclops annulatus* (Wierzejski, 1892) (Copepoda: Cyclopidea) as a predator of container-breeding mosquitoes in Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 97: 835-838
- Nam V.S., Yen N.T., Kay B.H., Marten G.G., Reid J.W.. 1998. Eradication of *Aedes aegypti* from a village in Vietnam using copepods and community participation. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*; 59: 657–660
- Nasci R.S., Hare S.G.F., Vecchione M.. 1987. Habitat associations of mosquito and copepod species. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*; 3: 593-600
- Pérez-Serna SM, Quiroz-Martínez H, Ornelas-Nava N, Badii MH, Sufírez MF, Rodríguez-Tovar ML. 1996. Prey selectivity of three aquatic predators of mosquito larvae. *S.W. Entomol.*; 21:471-475
- Pons M., Sans K., Gómez M., Calliari D.. 2008. Evaluation of *Culex pipiens* larvae control by cyclopoid copepods in an urban cemetery of Montevideo, Uruguay. *J. Vector Ecology*; 33(1): 212-215
- Rao T.R., Kumar R.. 2002. Patterns of prey selectivity in the cyclopoid copepod *Mesocyclops thermocyclopoides*. *Aquat. Ecol.*; 36: 411-424
- Rawlins S.C., Martínez R., Wiltshire S., Clarke D., Prabhakar P., Spinks M.. 1997. Evaluation of Caribbean strains of *Macrocyclus* and *Mesocyclops* (Cyclopoida: Cyclopidae) as biological control tools for the dengue vector *Aedes aegypti*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*; 13: 18-23
- Rey J.R., O'Connell S., Suairez S., Menéndez Z, Lounibos L.P., Byer G.. 2004. Laboratory and field studies of *Macrocyclus albidus* (Crustacea: Copepoda) for biological control of mosquitoes in artificial containers in a subtropical environment. *J. Vector Ecol.*; 29:124-134
- Rivière F, Thirel R. 1981. La prédation du copépode *Mesocyclops leuckartipilosa* (Crustacea) sur les larves de *Aedes (Stegomyia) aegypti* et *Ae. (St.) polynesiensis* (Dip.: Culicidae): essais préliminaires d'utilisation comme agent de lutte biologique. *Entomophaga*; 26:427-439
- Santos L.U., Andrade C.F.S.. 1997. Survey of cyclopids (Crustacea, Copepoda) in Brazil and preliminary screening of their potential as dengue vector predators. *Revista Saude Pub.*; 31: 221-226.
- Soumare MKF, Cilek JE, Schreiber ET. 2004. Prey and size preference of *Mesocyclops longisetus* (Copepoda) for *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* larvae. *J. Am. Mosq Control Assoc.*; 20: 305-310
- Suairez-Rubio M., Suairez M.F.. 2004. The use of the copepod *Mesocyclops longisetus* as a biological control agent for *Aedes aegypti* in Cali, Colombia. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*; 20: 401-404
- Tietze N.S., Hester P.G., Shaffer K.R., Prescott S.J., Schreiber E.T.. 1994. Integrated management of waste tire mosquitoes utilizing *Mesocyclops longisetus* (Copepoda: Cyclopidae), *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, *Bacillus sphaericus*, and methoprene. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*; 10: 363-373

- Torres-Estrada J.L., Rodriguez M.H., Cruz-Ldpez L., Arredondo-Jimenez J.I.. 2001. Selective oviposition by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in response to *Mesocyclops longisetus* (Copepoda: Cyclopoidea) under laboratory and field conditions. *J. Med. Entomol.*; 38: 188-192
- World Health Organization. 1995. Guidelines for Dengue Surveillance and Mosquito Control. Western Pacific Education in Action Series, No. 8, VIII + 104 pp.
- World Health Organization. 1997. Vector control: methods for use by individuals and communities. Prepared by Jan A. Rozendaal; pp.412

## **RINGRAZIAMENTI**

Voglio ringraziare tutti coloro che mi hanno aiutato in questo lavoro, ciascuno col proprio contributo.

Il Prof. Giorgio Celli e il Prof. Stefano Maini, per avermi insegnato a lavorare per le idee.

Romeo Bellini, infaticabile guida e punto di riferimento in tante avventure.

Marco Carrieri, la cui competenza e disponibilità è stata fondamentale.

Ogni altro mio collega del Centro Agricoltura Ambiente “G.Nicoli” e la sua direzione per il sostegno ricevuto in ogni momento.

Ringrazio infine il Prof. Giuseppe Lucio Pesce e il Prof. Ivano Ansaloni per il prezioso supporto nella fase di determinazione tassonomica.